

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA



**TESIS DOCTORAL**

**Divergencias genéticas y proteómicas en la fisiopatogenia de  
las neoplasias mieloproliferativas (NMP)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Miguel Gallardo Delgado

Directores

Joaquín Martínez-López  
Rosa María Ayala Díaz

Madrid, 2012

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**



# **Divergencias genéticas y proteómicas en la fisiopatogenia de las neoplasias mieloproliferativas (NMP)**

**Memoria para optar al grado de doctor presentada por**

**Miguel Gallardo Delgado**

Bajo la dirección de los doctores

Joaquín Martínez-López

Rosa María Ayala Díaz

**TESIS DOCTORAL**

Madrid, 2011



# Agradecimientos

Este trabajo esta dedicado a todas aquellas personas que lo han hecho posible.

En primer lugar a Joaquin Martinez-Lopez, por darme la oportunidad de desarrollarme como investigador a su lado, por su supervisión, por apoyarme y motivarme, así como enseñarme la importancia de la colaboración en el mundo científico. Tampoco puedo olvidarme de Enriqueta Albizua, con la que compartí los primeros años de investigación y que ha sido importante hasta la última pagina, tanto en lo profesional como en lo personal, esta tesis tiene mucho de tu espíritu Queta. Me gustaría agradecer también a Rosa Ayala su apoyo y supervisión en esta tesis, su experiencia y su forma de ver las cosas tanto en el trabajo como en la vida han sido muy importantes para mí. A Maria Liz Paciello por hacer más amable el día a día. Agradecer a Florinda Gilsanz su confianza depositada.

Quiero agradecer a todas las personas que han intervenido en las numerosas colaboraciones que se han realizado en esta tesis, Alberto Paradela y Marisol Fernandez del CNB, Oscar Toldos, Miguel Angel Martín y Rosa Maria García-Martín de anatomía patológica, Beatriz Sánchez-Espiridion y Miguel Ángel Piris del CNIO, Eulalia Puigdecamet y Beatriz Bellosillo del hospital del Mar y Juan Carlos González-Armas del centro de investigación 12O.

Muchas gracias a Santiago Barrio por ser un buen contrapunto con el que discutir, además de un buen amigo. A Elena Fernandez-Redondo y a Marisa Candelas, haciendo que se desee ir a trabajar cada mañana. A Ana Jiménez por su colaboración, pero también por ser como es. A todo el personal de investigación, Alicia, Inma, Ana, Daniel y Silvia.

A todo el personal de Biología molecular, Romi, Paloma, Blanca, Pilar, M<sup>a</sup>Jose, Elena, Eva, etc., y del servicio de hematología, Marife, Cruz, etc. Perdonar si me olvido de alguien.

Por último, a mi madre, su vital colaboración a nivel laboral es mínima en comparación con su apoyo a nivel personal. A mi padre y a mi hermana. A mi sobrino, Alejandro.

Muchas gracias a todos, y a quien haya podido olvidar, gracias.



# Índice

<b>ÍNDICE</b>	<b>I</b>
<b>GLOSARIO DE ABREVIATURAS</b>	<b>II</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>III</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>PARTE I: Las neoplasias mieloproliferativas</b>	<b>1</b>
1. Bases Moleculares	1
2. Clasificación	2
<b>PARTE II: Policitemia Vera</b>	<b>2</b>
1. Epidemiología	3
2. Características clínicas	3
3. Hallazgos de laboratorio /Morfología	4
4. Genética	5
5. Diagnóstico	5
6. Factores predictivos y pronóstico	6
7. Tratamiento	7
<b>PARTE II: Trombocitemia Esencial</b>	<b>9</b>
1. Epidemiología	9
2. Características clínicas	10
3. Morfología	10
4. Genética	11
5. Diagnóstico	11

6. Factores predictivos y pronóstico	12
7. Tratamiento	12
<b>PARTE IV: Fisiopatogenia de la Policitemia Vera</b>	
y la Trombocitemia Esencial	13
<b>PARTE V: Estudios genéticos. Los análisis de <i>microarrays</i></b>	18
1. <i>Microarrays</i> de expresión	19
2. <i>Microarrays</i> de metilación	21
3. <i>Microarrays</i> de microRNAs	23
4. Estudios de <i>microarrays</i> en NMPc	23
<b>Parte VI: Estudios proteómicos. Los geles DIGE y</b>	
la espectrometría de masas	25
1. Estudios DIGE/MS en NMPc	26
<b>2. FUNDAMENTOS</b>	<b>27</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>29</b>
<b>PARTE I: Muestras y pacientes</b>	29
<b>PARTE II: Análisis de expresión génica</b>	32
1. <i>Microarray</i> de expresión	32
2. <i>Macroarray</i> , PCR cuantitativa en tiempo real	33
3. PCR cuantitativa en tiempo real de ensayos TaqMan	34
<b>PARTE III: Análisis de metilación</b>	34
<b>PARTE IV: Análisis de microRNA</b>	36
<b>PARTE V: Análisis proteómico</b>	36
1. Geles 2D y espectrometría de masas	36
2. Western Blot	38
3. Citometría de flujo	39

4. Inmunohistoquímica	40
PARTE VI: Análisis funcional	41
1. Cultivos de línea celular HEL	41
2. Cultivos de colonias eritroides	42
2.1 Cultivos de colonias eritroides de células mononucleadas de sangre periférica	42
2.2. Cultivos de colonias eritroides de progenitores hematopoiéticos de médula ósea	43
2.3. Contaje de colonias eritroides	43
2.4. Test de viabilidad	43
2.5. Citometría de flujo	43
2.6. Cytometric Bead Array (CBAs)	44
PARTE V: Análisis bioinformático y estadístico de los datos	45
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>50</b>
PARTE I: Análisis de expresión génica	50
1. <i>Microarray</i> de expresión	50
2. <i>Macroarray</i> , PCR cuantitativa en tiempo real	53
2.1 <i>Macroarray, modelo 1: PV y TE positiva</i>	53
2.2 <i>Macroarray, modelo 2: TE positiva,         TE negativa, TS</i>	55
PARTE III: Análisis de metilación	57
1. PV vs TE positiva	57
2. PV vs Controles	58
PARTE IV: Análisis de microRNAs	59
PARTE V: Análisis proteómicos	59
1. Geles 2D DIGE y espectrometría de masas	59



1.1 <i>PV vs TE positiva</i>	59
1.2 <i>TE positiva vs Control</i>	63
1.3 <i>PV vs Control</i>	63
2. Western Blot	63
3. Citometría de flujo	64
4. Inmunohistoquímica	65
<b>PARTE VI: Análisis funcionales</b>	68
1. Línea HEL	69
1.1 Test de viabilidad	69
1.2 WB	70
2. Cultivos de colonias eritroides	70
2.1 Contaje de colonias y test de viabilidad	71
2.2 Citometría de flujo	72
2.3. Cytometric Bead Arrays (CBAs)	73
3. Cultivos de colonias eritroides en células CD34+ de MO	74
<b>5. DISCUSIÓN</b>	79
 PARTE I: Nuevos biomarcadores en NMPc. CD44, una nueva herramienta diagnóstica	79
 PARTE II : ZNF577, una anomalía en el perfil epigenético de las NMPc	83
 PARTE III: MMP14, las metalo-proteasas en la fisiopatogenia de las NMPc.	84
 PARTE IV: La implicación de la chaperona HSP70 en la fisiopatogenia de PV	90

<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>95</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>96</b>
<b>8. LISTADO DE PUBLICACIONES</b>	<b>105</b>
<b>9. ANEXOS</b>	<b>107</b>

## INDICE DE ABREVIATURAS

**AAS:** Acido acetil salicílico

**ABL1:** c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase

**ADN/DNA:** Ácido desoxiribonucleico

**AKT:** v-akt murine thymoma viral oncogene homolog

**APC:** allophycocyanin

**ASXL1:** additional sex combs like 1

**BM:** Bone marrow

**BFU-E:** Burst formation Unit-Erythroid

**BTK:** Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase

**CBA:** Cytometric Bead array

**CCE:** Crecimiento de colonias endógenas

**CD34:** Cluster differentiation 34

**CD41a:** Cluster differentiation 41a

**CD44:** Cluster differentiation 44

**CD45:** Cluster differentiation 45

**CD71:** Cluster differentiation 71

**cDNA:** DNA codificante

**CISH:** cytokine inducible SH2-containing protein

**CMF:** Citometría de flujo

**CpG:** Cytosine phosphate Guanine

**cRNA:** RNA complementario

**Ct:** Cycle threshold

**CXCL12:** chemokine (C-X-C motif) ligand 12

**Cy3:** Cianina 3

**Cy5:** Cianina 5

**DIGE:** Differential in gel electrophoresis

**DMSO:** Dimethyl sulfoxide

**ECL:** Enzymatic Chemiluminescence

**EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid, ácido etilen-diamino-tetraacético

**ELISA:** Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

**ELN:** European Leukemia Net

**EPO:** Erythropoietina

**ERK:** MAPK1, mitogen-activated protein kinase 1

**ET:** Essential thrombocythemia

**EZH2:** enhancer of zeste homolog 2

**FCER1G:** Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; gamma polypeptide

<b>FDR:</b> False Discovery Rate	<b>IKAROS:</b> IKZF1, IKAROS family zinc finger 1
<b>FITC:</b> fluorescein isothiocyanate	<b>IL-3:</b> Interleukina 3
<b>FCM:</b> Flow Cytometry	<b>JAK2:</b> Janus kinase 2
<b>FOSB:</b> FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	<b>KNN:</b> k-nearest neighbor algorithm
<b>GAPDH:</b> glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<b>LCE:</b> Leucemia eosinofílica
<b>GATA-1:</b> GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1)	<b>LCN:</b> Leucemia crónica neutrofílica
<b>GEPAS:</b> Gene Expression Profile Analysis Suite	<b>LDA/TLD:</b> Tarjeta microfluídica
<b>GIN51:</b> GINS complex subunit 1 (Psf1 homolog)	<b>LMA:</b> Leucemia mieloide aguda
<b>g/dL:</b> gramos por decilitro	<b>LMC:</b> Leucemia mieloide crónica
<b>GSEA:</b> Gen Set Enrichment Analysis	<b>LNK:</b> Lymphocyte adapter protein
<b>HEL:</b> Línea celular de eritroleucemia	<b>LTA4H:</b> leukotriene A4 hydrolase
<b>HSC:</b> Haematopoietic stem cell	<b>LYN:</b> -yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog
<b>HSPA1A/HSP70:</b> heat shock 70kDa protein 1A	<b>MAP2K1:</b> MEK, mitogen-activated protein kinase kinase 1
<b>HU:</b> Hidroxiurea	<b>MAPK:</b> mitogen-activated protein kinase
<b>IDH1/2:</b> isocitrate dehydrogenase 1/2 (NADP+)	<b>MFP:</b> Mielofibrosis primaria
<b>IFN-α:</b> Interferon alfa	<b>miRNAs:</b> microRNAs
<b>IHC:</b> Immunohistochemistry	<b>MMP14:</b> matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)
<b>IHQ:</b> Inmunohistoquímica	<b>MO:</b> Médula ósea
	<b>MPL:</b> Myeloproliferative leukemia virus oncogene
	<b>MPN:</b> Myeloproliferative neoplasms
	<b>MS:</b> Mass spectrometry

**NF-E2:** nuclear factor (erythroid-derived 2), 45kDa

**NME2:** non-metastatic cells 2, protein (NM23B) expressed in

**NMP/NMPc:** Neoplasias mieloproliferativas crónicas

**P<sup>32</sup>:** Fósforo 32

**P38:** mitogen-activated protein kinase 14

**PBS:** Phosphate buffer saline

**PCR:** Polymerase Chain reaction

**PDGF:** platelet-derived growth factor

**PE:** Phycoerythrin

**PerCP:** Peridinin chlorophyll protein

**Phi negativas:** philadelphia negativas

**PI3K:** phosphoinositide-3-kinase

**PIK3CA:** phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide

**PIM-1:** pim-1 oncogene

**POMELO II:** permutation-based tests for class comparisons

**PV:** Policitemia Vera

**RNA/ARN:** Acido ribonucleico

**RT-PCR:** Real-time PCR

**SCF:** Stem cell factor

**SDS-PAGE:** sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

**SERPINB1:** serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1

**SKAP2:** src kinase associated phosphoprotein 2

**SMD:** Síndromes mielodisplásicos

**SNP:** Single-nucleotide polymorphism

**SOCS:** suppressor of cytokine signaling

**Src:** v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian) family

**STAT:** signal transducer and activator of transcription

**TE:** Trombocitemia Esencial

**TET2:** tet oncogene family member 2

**TGFBR3:** transforming growth factor, beta receptor III

**TIMP2:** TIMP metalloproteinase inhibitor 2

**TNASAS:** “This is not a substitute for a statistician”

**TNFAIP6:** tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6

**TNF-alpha:** tumor necrosis factor alpha

**TPO:** Trombopoietina

**T-REX:** “Tools for RElevant gene seleXion”

**TS:** Trombocitosis secundaria

**VCY:** variable charge, Y-linked

**WT:** Wild-Type

**WB:** Western Blot

**ZNF577:** zinc finger protein 57

# ABSTRACT

## Introduction

Philadelphia negative chronic myeloproliferative neoplasms (MPN) are clonal haematopoietic stem cell (HSC) disorders characterized by the proliferation of one or more of the myeloid lineage (i.e. granulocytic, erythroid, megakaryocytic). This study is focused in two MPN, polycythaemia vera (PV) and essential thrombocythemia (ET). Both diseases are associated with the acquired somatic mutation of *JAK2 V617F*: PV in 90% and ET in 50-60%. However, *JAK2* mutation has not showed to be sufficient to develop any of both diseases, and the first or unique clonal event; and moreover, not enough to explain the phenotype divergence between ET and PV.

## Aims

The aim of this work was to investigate genes and proteins involved in the physiopathogenic events and phenotype divergence between PV and ET, in order to obtain a better knowledge of MPN and for a future application as diagnostic tools or therapeutic targets.

## Methods

We performed a gene and protein screening looking for differences between ET and PV at different levels: gene expression (by *microarray* expression and RT-PCR), epigenetic profile (methylation *microarray*) and protein expression (by GEL 2D-DIGE/MS). Differential expression of every gene and/or protein was confirmed by proteomic level, immunohistochemistry (IHC), flow cytometry (FCM) and western blot (WB). Additionally, physiopathogenic role of validated proteins, HSP70, MMP14 and CD44 in MPN was confirmed by functional studies (inhibition assays over HEL cell line and burst formation unit erythroid (BFU-E) cultures from mononuclear peripheral blood cells and bone marrow (BM) HSC).

## Results

Gene expression analysis showed *MMP14* and *CD44* genes differentially expressed in RT-PCR between PV and ET. Protein expression analysis by GEL 2D-DIGE/MS demonstrated three proteins with differential expression: HSPA1A (HSP70), SERPINB1 and LTA4H. Additionally, epigenetic analysis showed *ZNF577* gene with a differential methylation profile between PV and ET *JAK2 V617F*. IHC studies resulted in CD44 and SERPINB1 as useful potential biomarkers. CD44 was over-expressed in ET *JAK2* wild type granulocytes of BM, and SERPINB1 was over-expressed in MPN (ET, PV and primary myelofibrosis). Functional studies showed BFU-E growth and viability cell decrease after MMP14 inhibition (*Marimastat*), CD44 antibody blocker (*C7923*) and HSP70 inhibitor (*KNK437*). Of interest, *Marimastat* and *C7923* produced specific erythroid lineage decrease, whereas *KNK437* reduced lineage in the same way. However, cultures after *KNK437* treatment showed a high percentage of apoptotic erythroid cells, especially in PV. In *C7923* assay, inhibition was produced via pMEK and pP38; in *Marimastat* assay inhibition was produced via pMEK, pP38, pSTAT and pJAK2; and in *KNK437* assay inhibition was produced via pMEK and pJAK2

## Conclusions

CD44 and SERPINB1 are potential biomarkers and could be used as diagnostic tool in ET *JAK2* wild type and MPN respectively. Furthermore, CD44, along with MMP14, could be playing a key role in erythroid proliferation by MAPK and JAK-STAT pathway activation. They are attractive therapeutic targets in MPNs. Finally, HSP70 could be playing a key role in physiopathology and phenotypic divergence between PV and ET by JAK-STAT pathway activation, providing higher survival over erythroid lineage. In this way, HSP70 could become a promising therapeutic target in PV, and *KNK437* a potential treatment.





## **1. Introducción**

### **Parte I: Las neoplasias mieloproliferativas**

Las neoplasias mieloproliferativas (NMP) engloban un nutrido número de patologías, donde se encuadran las NMP philadelphia negativas clásicas, entre las que se incluyen, la policitemia vera (PV), la trombocitemia esencial (TE) y la mielofibrosis primaria (MFP)<sup>1,2</sup>. Estas se caracterizan por una expansión clonal de la célula madre hematopoyética que desemboca en la excesiva proliferación de las diferentes líneas mieloides, generando los diferentes fenotipos patológicos<sup>3,4</sup>.

#### **1. Bases moleculares**

En el año 2005 se produce un gran avance en las NMPc, se descubre un nexo de unión entre las NPM phi negativas, la mutación puntual *V617F* del exón 14 del gen *JAK2*<sup>5-8</sup>. Esta produce una ganancia de función y una activación constitutiva debido a la inhabilitación del dominio autoinhibidor JH2 de la proteína que codifica. La proteína JAK2 es activada a través de la cascada de señalización derivada de diferentes receptores de citocinas, el receptor de PDGF, de EPO o de TPO. Estos receptores son activados por sus correspondientes ligandos, y la citada mutación produce hipersensibilización a estos. La activación de JAK2 genera una activación de diversas vías pro-proliferativas tales como STAT, MAPK o PI3K-AKT<sup>9</sup>. El proceso es controlado por la molécula SOCS, la cual produce una inhibición de la activación de JAK2, siendo esta omitida cuando se genera la mutación *JAK2 V617F*. Sin embargo, dicha mutación no es única de las NMPc, sino que también ocurre en cierta proporción en los síndromes mielodisplásicos (SMD) y en la leucemia mieloide aguda (LMA)<sup>10</sup>.

## **2. Clasificación:**

Las neoplasias mieloproliferativas se clasifican en: la leucemia mieloide aguda (LMA), los síndromes mielodisplásicos (SMD), las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPc), una categoría intermedia entre neoplasia mielodisplásica/mieloproliferativa (SMD/NMP), y por último, las neoplasias mieloides asociadas con eosinofilia y anormalidades moleculares específicas.

Las NMPc se clasifican en “clásicas”: donde se encuentran la leucemia mieloide crónica (LMC), la policitemia vera (PV), la trombocitemia esencial (TE), la mielofibrosis primaria (MFP) y en “otras”: donde se encuentran la leucemia crónica neutrofílica (LCN), la leucemia crónica eosinofílica (LCE), la mastocitosis y los mieloproliferativos neoplásicos inclasificables.

El objeto de estudio de la presente tesis serán la Policitemia Vera y la Trombocitemia Esencial.

### **Parte II: Policitemia Vera**

La Policitemia Vera se caracteriza por un incremento en la proliferación de las series eritroide, mieloide y megacariocítica con predominio en el incremento de glóbulos rojos, independiente de los mecanismos comunes de regulación eritropoyética. Más de un 95% de los pacientes poseen la mutación *JAK2 V617F* u otra similar del mismo gen. La policitemia vera posee dos fases, una primera pre-policitémica y una segunda policitémica asociada a un incremento de masa eritrocitaria. Esta última fase puede desembocar en una tercera fase post-policitémica mielofibrótica, que implica citopenias, hematopoyesis ineficaz, fibrosis de la médula ósea, hematopoyesis extramédular, y esplenomegalia. Con una baja incidencia la patología progresa hacia fase mielodisplásica/pre-leucémica o leucemia aguda.

## **1. Epidemiología:**

La incidencia se incrementa según avanza la edad del individuo, entre 0.7 y 2.6 por 100.000 habitantes de Europa y América del Norte, y en mucha menor medida en Japón. Existe una predominancia de varones sobre mujeres (1-2:1). La edad media del diagnóstico son 60 años, y por debajo de 20 es raro encontrar pacientes.

Etiología: La causa de la patología es desconocida, pero en algunas familias es patente una predisposición genética. Las radiaciones ionizantes y la exposición a toxinas son sugestivas de causa en ciertos pacientes. Afecta a la sangre y médula ósea principalmente, pero el hígado y el bazo también pueden estar afectados, así como cualquier órgano que pueda ser dañado como consecuencia de problemas vasculares derivados del exceso de masa eritrocitaria.

## **2. Características clínicas:**

Aproximadamente en el 20% de los pacientes existen eventos trombóticos venosos o arteriales, e isquemia cardiaca en la historia médica o incluso en la primera manifestación de la patología. La PV puede ser causa subyacente de trombosis esplénica, portal y mesentérica así como del síndrome de Budd-Chiari. El sangrado también es frecuente, en especial el digestivo. Dolor de cabeza, vértigos, parestesias, prurito, eritromelalgias, son síntomas comunes. En el 70% de los casos existe esplenomegalia palpable y en un 40% hepatomegalia. La confirmación del diagnóstico incluye bajos niveles de EPO, crecimiento de formadores de colonias endógenas (CCE) y detección de la mutación *JAK2 V617F* o alguna mutación similar (mutaciones del exón 12 de JAK2). En ocasiones, la hemoglobina o la masa eritrocitaria no se encuentra suficientemente elevada para ser sugestiva de PV, en pacientes con la patología en fase pre-policitémica o PV latente.

### 3. Hallazgos de laboratorio /Morfología:

*Hallazgos en sangre periférica:* Durante la fase pre-policitémica y policitémica la sangre periférica muestra un exceso normocrómico y normocítico de eritrocitos. Si existe deficiencia de hierro, los eritrocitos se presentan hipocrómicos y microcíticos. Existe neutrofilia y raramente basofilia. En escasas ocasiones se encuentran granulocitos inmaduros, pero no se observan blastos generalmente. El 15% de PV pueden cursar con trombocitosis, lo que dificulta el diagnóstico frente a la TE y por ello debe aplicarse un diagnóstico diferencial.

*Hallazgos en médula ósea:* Existe una hipercelularidad en la médula ósea. Se observa una panmielosis, siendo preponderante el número de precursores eritrocíticos y megacariocíticos. Los megacariocitos ven incrementado su número, particularmente en casos con exceso de plaquetas, mostrando caracteres anormales como núcleos hiperlobulados en la fase temprana de la patología. En la fase policitémica es mas común la panmielosis, lo cual ayuda a diferenciar PV de TE. Los megacariocitos forman estructuras racimales cercanas a las trabéculas óseas, con cierto grado de pleomorfismo y diferentes rangos de tamaño, rasgo distintivo de la PV frente a la TE. Los megacariocitos poseen núcleos profundamente lobulados o con ciertas anormalidades asociadas a un incremento de la reticulina. El 20% de los casos poseen agregados nodulares linfoides. Hay una ausencia de los depósitos de hierro en el 95% de los casos de aspirados y biopsias medulares. Durante la fase post-policitémica se produce un progresivo decrecimiento eritrocítico, mientras que el bazo se va agrandando y aumentan las alteraciones de la médula ósea. Las progresiones mas comunes de la patología es hacia mielofibrosis post-PV acompañada de metaplasia mieloide con extensión en la sangre periférica de cuadro leucoeritroblástico, poiquilocitosis con eritrocitos en forma de lagrima y esplenomegalia. La fibrosis reticulínica y colágena de la médula ósea es típico de esta fase. Es común hipocelularidad, agrupaciones megacariocíticas hipercromáticas y de núcleo muy dismórfico

y prominente. Tanto la eritropoyesis como la granulopoyesis se ve disminuida, y en ocasiones particulares se observan sinusoides en la médula, y en algunas ocasiones, existe osteoesclerosis. Se genera un incremento de células inmaduras >10 % de blastos en la sangre periférica o la médula ósea y en ocasiones la presencia de mielodisplasia.

#### **4. Genética:**

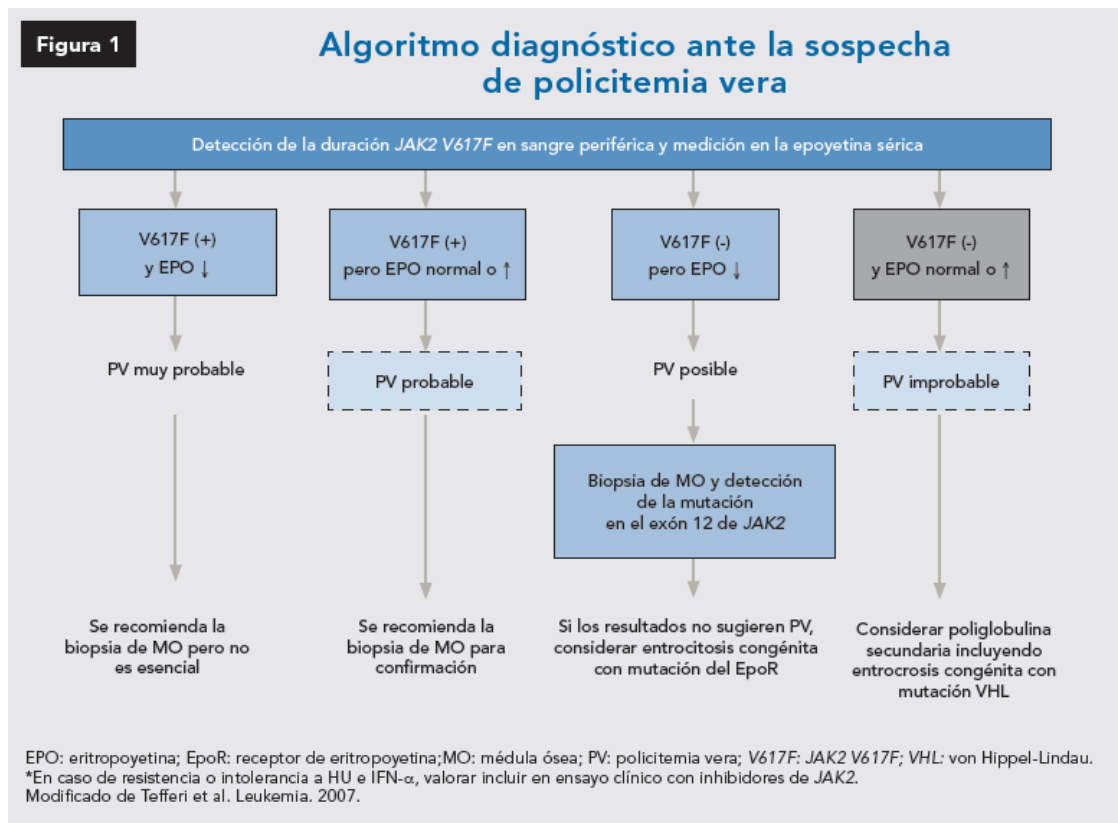
La anormalidad mas frecuente es la mutación *JAK2 V617F*, que ocurre en el 95% de los casos, pero no es única de la PV. La mutación se genera en la célula madre hematopoyética y se encuentra en células de la serie mieloide. Las células con dicha mutación poseen una hipersensibilidad a las citocinas, incluida la EPO. La mutación del exón 12 de *JAK2* es una alteración similar que se encuentra en la mayoría de pacientes con PV que no poseen la mutación *JAK2 V617F*. La citogenética es anormal, comúnmente positiva +8, +9, del(20q), del(13q), y del(9p), y en ocasiones +8 y +9 se encuentran juntas. Existen otras anormalidades cromosómicas en etapas post-policitémicas y con evolución hacia mielofibrosis.

#### **5. Diagnóstico:**

Para el diagnóstico de la PV durante su fase policitémica, los criterios mayores, son la evidencia de un incremento de la masa eritrocitaria (Hemoglobina >18.5 g/dL en hombres, y 16.5 g/dL en mujeres) acompañada de la presencia de la mutación *JAK2 V617F* o en su defecto, alguna de las mutaciones del exón 12 del gen *JAK2*<sup>11,12</sup>. Los criterios menores son valores de EPO bajos, formación de colonias eritroides endógenas *in vitro*, y por último, una médula ósea compatible con la morfología característica de la PV.

Para el correcto diagnóstico de PV es necesario el cumplimiento de dos criterios mayores y uno menor, o al menos un criterio mayor y dos menores.

Para el diagnóstico de la fase post-policitémica y mielofibrótica los criterios mayores consisten en un diagnóstico previo de PV y una fibrosis en la médula ósea de grado 2-3 en una escala de 0-3, o de grado 3-4 en una escala de 0-4. Adicionalmente debe cumplir al menos 2 de los criterios menores, que se comentan a continuación; una anemia sostenida en ausencia de terapia citorreductiva o requerimiento citorreductor por eritrocitosis; un cuadro leucoeritroblástico en sangre periférica; un incremento en la esplenomegalia palpable superior >5 cm ó el desarrollo de 3 síntomas constitucionales: una pérdida del 10% de peso en 6 meses, sudores nocturnos, y fiebre inexplicable (>37.5°C). (Figura 1).



**Figura 1:** Algoritmo diagnóstico de la PV.

## 6. Factores predictivos y pronóstico:

Con el tratamiento adecuado el tiempo de supervivencia está por encima de los 10 años dependiendo de los factores de riesgo adicionales a la avanzada edad. Muchos pacientes mueren por trombosis o hemorragias, y el 20% de los fallecidos lo hacen tras evolución a

mielodisplasia o leucemia mieloide aguda. La evolución a SMD o leucemia aguda es sólo de un 2-3% de los casos no tratados con agentes citotóxicos, y se eleva hasta el 10% de los tratados con ellos.

## **7. Tratamiento:**

El tratamiento de la PV clásicamente tiene por objeto la prevención de las complicaciones trombóticas y hemorrágicas, y del síndrome de hiperviscosidad derivado de la poliglobulia. Los pilares del tratamiento son las flebotomías, para reducir el hematocrito, la anti-agregación con ácido acetilsalicílico (AAS) y el tratamiento sintomático del prurito. Estas medidas se aplican a todos los pacientes, independientemente de su riesgo trombótico. Los pacientes de alto riesgo trombótico deben recibir también tratamiento citorreductor. Actualmente *JAK2 V617F* ha abierto una nueva opción terapéutica: el tratamiento etiológico de la patología con los inhibidores de *JAK2*.

La hidroxiurea (HU) ha demostrado en diversos ensayos clínicos su alta eficacia en la prevención de trombosis, por lo que actualmente es el tratamiento citorreductor de elección en pacientes con alto riesgo trombótico. Ejerce su acción mielosupresora como anti-metabolito de la síntesis de ADN inhibiendo a la enzima ribonucleótido reductasa. Tiene efectos antitrombóticos al producir disminución de leucocitos y de la expresión de moléculas de adhesión endotelial, y aumentar la síntesis de óxido nítrico. La dosis inicial es de 15-20 mg/kg/día hasta obtener respuesta (hematocrito<45%), y posteriormente una dosis de mantenimiento (la habitual de 10-20 mg/día). El potencial riesgo leucemógeno de la HU es un tema de controversia y preocupación, aunque hasta la fecha no haya estudios que lo demuestren claramente. En aproximadamente el 20% de los casos de PV y TE se produce falta de respuesta al tratamiento que puede conducir a la resistencia a HU. Los parámetros de respuesta a HU se rigen por criterios de la ELN (European Leukemia Net) (Tabla 1).



### Definición de Respuesta Clínico hematológica en Policitemia Vera (PV) ELN 2009

Grado de Respuesta	Criterios / Definiciones
<b>Respuesta Completa</b> (debe reunir todos los criterios)	1.- Hematocrito <45% sin flebotomías 2.- Cifra de plaquetas $\leq 400 \times 10^9/L$ 3.- Cifra de leucocitos $\leq 10 \times 10^9/L$ 4.- Bazo normal, por pruebas de imagen 5.- No síntomas relacionados con la patología
<b>Respuesta Parcial</b> En paciente que no cumplen todos los criterios de respuesta completa:	1.- Hematocrito <45% sin flebotomías ó 2.- Respuesta en 3 o más de los otros criterios referidos en Respuesta completa
<b>No Respuesta</b>	Cualquier tipo respuesta que no satisfaga/ corresponda a los criterios de respuesta parcial.

### Definición de Respuesta Clínico hematológica en Trombocitemia Esencial (TE) ELN 2009

Grado de Respuesta	Criterios / Definiciones
<b>Respuesta Completa</b> (debe reunir todos los criterios)	1.- Cifra de plaquetas $\leq 400 \times 10^9/L$ 2.- No síntomas relacionados con la patología 3.- Bazo normal, por pruebas de imagen 4.- Cifra de leucocitos $\leq 10 \times 10^9/L$
<b>Respuesta Parcial</b> En paciente que no cumplen todos los criterios de respuesta completa:	Cifra de plaquetas $\leq 600 \times 10^9/L$ , ó descenso de la cifra de plaquetas en más del 50% respecto a la cifra basal
<b>No Respuesta</b>	Cualquier tipo respuesta que no satisfaga/ corresponda a los criterios de respuesta parcial.

**Tabla 1:** Criterios de respuesta hematimétricos al tratamiento en NMPc según la European Leukemia Net (ELN)<sup>13,14</sup>.

El interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) constituye una alternativa a la HU en pacientes menores de 40 años ó en caso de contraindicación a HU o no respuesta a la misma.

La presencia de mutaciones de *JAK2* que originan un aumento de función de esta tirosín kinasa ha dado lugar al desarrollo clínico de inhibidores de *JAK2* para el tratamiento de pacientes con NMPc. Actualmente se encuentran ya en ensayos clínicos fase II en PV y en fase III en mielofibrosis primaria y secundaria a PV o TE. Aunque no son específicos de la mutación *JAK2 V617F* sino que actúan también sobre JAK2 no mutado, así como sobre JAK1 y FLT3. Los resultados de dos de ellos, INCBO18424 y CEP701, en pacientes con PV refractaria a HU son los siguientes: gran eficacia en disminución de esplenomegalia, sintomatología, y de respuestas alcanzadas, con remisiones entre el 97 y el 100% (si se suman remisiones completas y parciales), con una importante papel en la inhibición de citocinas en el control de los síntomas<sup>2,15-18</sup>.

### **Parte III: Trombocitemia Esencial**

La Trombocitemia Esencial (TE) es una neoplasia mieloproliferativa crónica que implica a la línea megacariocítica. Se caracteriza por una trombocitosis (Plaquetas  $>450 \times 10^9/L$ ) en sangre periférica e incremento de megacariocitos maduros de gran tamaño en la médula ósea, así como por cuadros clínicos trombóticos y/o hemorrágicos. No existen marcadores biológicos o genéticos específicos para la TE, y otras causas de trombocitosis deben ser excluidas para su diagnóstico.

#### **1. Epidemiología:**

Su incidencia es desconocida, pero se estima en 0.6-2.5 por cada 100.000 personas por año. No existe predilección por sexos, pero si por personas entre los 50-60 años. Un segundo grupo con mayor incidencia son mujeres con edades cercanas a los 30 años. En niños se

producen pocos casos e infrecuentemente se tratan de trombocitosis hereditarias. Se produce principalmente en la médula ósea, mientras que el bazo no juega un papel hematopoyético, pero sí de secuestro plaquetario.

## **2. Características clínicas:**

Más de la mitad de los pacientes son asintomáticos cuando se observa un exceso de recuento plaquetario en sangre periférica. El resto de pacientes presenta manifestaciones trombóticas, como trombosis microvascular que pueden desembocar en ataques isquémicos que cursan con parestesias y gangrena. Puede ocurrir la trombosis de grandes venas o arterias, siendo la TE una causa subyacente de trombosis de la vena esplénica o hepática generando un síndrome de Budd-Chiari. Pueden producirse sangrados, más comúnmente en las mucosas como la gástrica. La esplenomegalia se produce en un 50% de los casos y la hepatomegalia en un 15-20%. La biopsia de médula ósea es especialmente útil para el diagnóstico de la patología.

## **3. Morfología:**

*Hallazgos en sangre periférica:* Se observa una marcada trombocitosis en la sangre periférica de los pacientes. Las plaquetas suelen presentar anisocitosis, así como diferentes formas, y en raros casos agranulación. El conteo de leucocitos suele ser normal, aunque no es rara su elevación. La basofilia es ausente o mínima, mientras que las células eritrocitarias suelen ser normocíticas y normocrómicas a excepción de que se produzcan deficiencias de hierro causadas por hemorragias, en cuyo caso serían hipocrómicas y microcíticas.

*Hallazgos en médula ósea:* La biopsia de médula ósea muestra una normocelularidad o leve hipercelularidad. La anomalía más característica es la proliferación megacariocítica con predominancia de formas grandes y gigantes, con núcleos hiperlobulados. En pocos casos existe proliferación de precursores eritroides, particularmente aquellos que han sufrido

hemorragias, aunque la proliferación granulocítica es muy inusual, y en caso de existir, es de forma muy leve. No hay incremento de mieloblastos ni de mielodisplasia, al igual que de la fibrosis, pero en ocasiones puede estar incrementada. Los aspirados de médula ósea revelan el incremento megacariocítico y la diversidad de tamaños y formas, así como las agrupaciones plaquetarias. Los depósitos de hierro están presentes en el 40-70% de los pacientes diagnosticados. La existencia de diseritropoyesis o disgranulopoyesis sugieren mas el diagnóstico de SMD que el de TE.

#### **4. Genética:**

No existen anormalidades específicas en la TE. El 40-50% de los pacientes posee la mutación *JAK2 V617F*. El 1% de los casos de TE poseen la ganancia de función del gen *MPL* debido a la mutación *MPL W515K/L*. Ambas mutaciones no se encuentran en trombocitosis reactivas. Tan sólo el 5-10% de los pacientes poseen un cariotipo anómalo. Estas anormalidades incluyen +8, anormalidades del 9q ó del 20q. Al igual que la PV, se postula el origen de la patología en la célula madre hematopoyética y las anormalidades pueden verse reflejadas en la línea mieloide.

#### **5. Diagnóstico:**

Los pacientes de TE deben cumplimentar los siguientes 4 criterios diagnósticos (Tabla 1): un conteo plaquetario mantenido superior a  $>450 \times 10^9/L$ . Una biopsia de médula ósea que muestra proliferación megacariocítica tanto en número como en tamaño de megacariocitos maduros, sin una significativa desviación a la izquierda de la mielopoyesis, granulopoyesis y eritropoiesis. No cumplir los criterios diagnósticos compatibles de la PV, MFP, LMC, SMD u otras neoplasias mieloides. Presencia de la mutación *JAK2 V617F* u otro marcador clonal<sup>11,12</sup>, o en su ausencia, evidencia de no ser trombocitosis reactiva (Tabla 1).

## 6. Factores predictivos y pronósticos:

La TE posee un largo intervalo asintomático, interrumpido ocasionalmente por eventos trombóticos y/o hemorrágicos. Esta patología puede evolucionar en fibrosis médular asociada a metaplasia mieloide. En menos del 5% de los casos, evolucionan a leucemia mieloide aguda, normalmente tras un tratamiento citotóxico.

La supervivencia media es de 10-15 años. Su incidencia es mayor en personas de mediana edad.

## 7. Tratamiento:

El tratamiento de la TE tiene grandes similitudes con el de PV. Al igual que este, se tiene por objeto fundamental la prevención de las complicaciones trombóticas y el uso de AAS esta indicado para ello. Los pacientes de alto riesgo trombótico también deben recibir tratamiento citorreductor, y al igual que en PV, *JAK2 V617F* ha abierto la opción de los inhibidores de *JAK2*.

En este caso la hidroxiurea (HU) también es el tratamiento citorreductor de elección en pacientes con alto riesgo trombótico.

La segunda línea de tratamiento ante la refractariedad de la HU o la incompatibilidad de dicho tratamiento con el paciente es el Anagrelide, un fármaco inhibidor de la maduración del megacariocito.

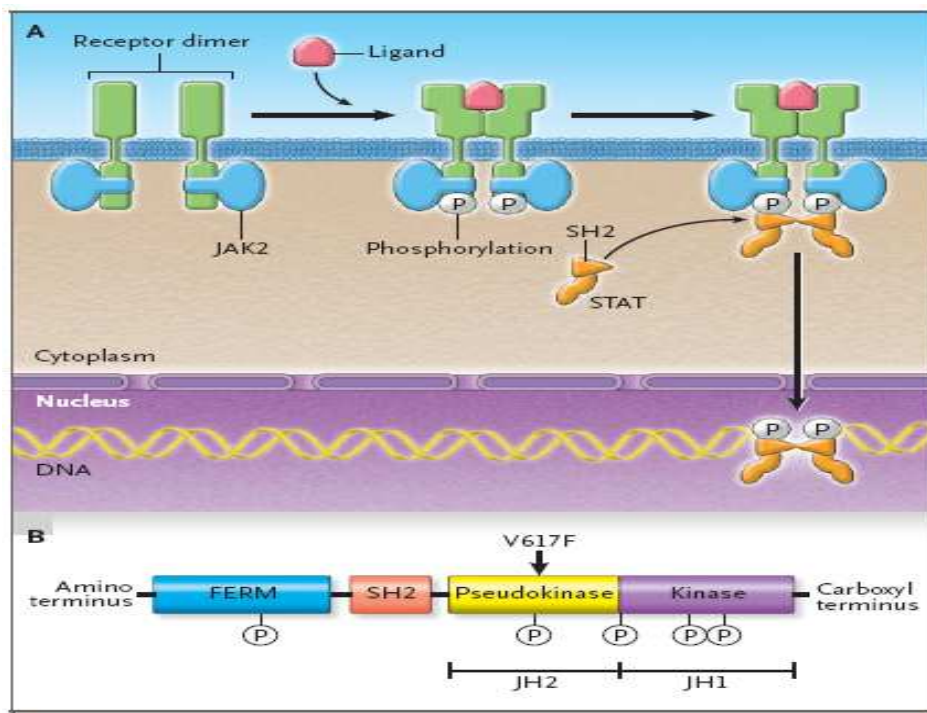
En pacientes menores de 40 años el interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) es una alternativa como primera línea de tratamiento.

Como última línea están establecidas otras drogas como agentes alquilantes: busulfán, melfalán, o P<sup>32</sup>, con relativo éxito en su tratamiento, pero con alto riesgo leucemogénico.

Los ensayos clínicos abiertos de *JAK2* inhibidor auguran otras opciones terapéuticas para esta patología de igual manera que en PV, inclusive para los casos de TE negativa, ya que dichos inhibidores son eficaces en no portadores de la mutación *JAK2 V617*<sup>2,15,17-20</sup>.

#### Parte IV: Fisiopatogenia de la Policitemia Vera y la Trombocitemia Esencial

Los mecanismos moleculares de ambas neoplasias son desconocidos en profundidad, pero numerosos investigadores han desarrollado diversos estudios e hipótesis que son motivo de debate en la fisiopatogenia de la TE y la PV<sup>3,4,6</sup>. Sin embargo, no se puede hablar de la fisiopatogenia molecular que motiva las NMPc, TE y PV, sin hablar del gen *JAK2* y la mutación *JAK2* V617F.



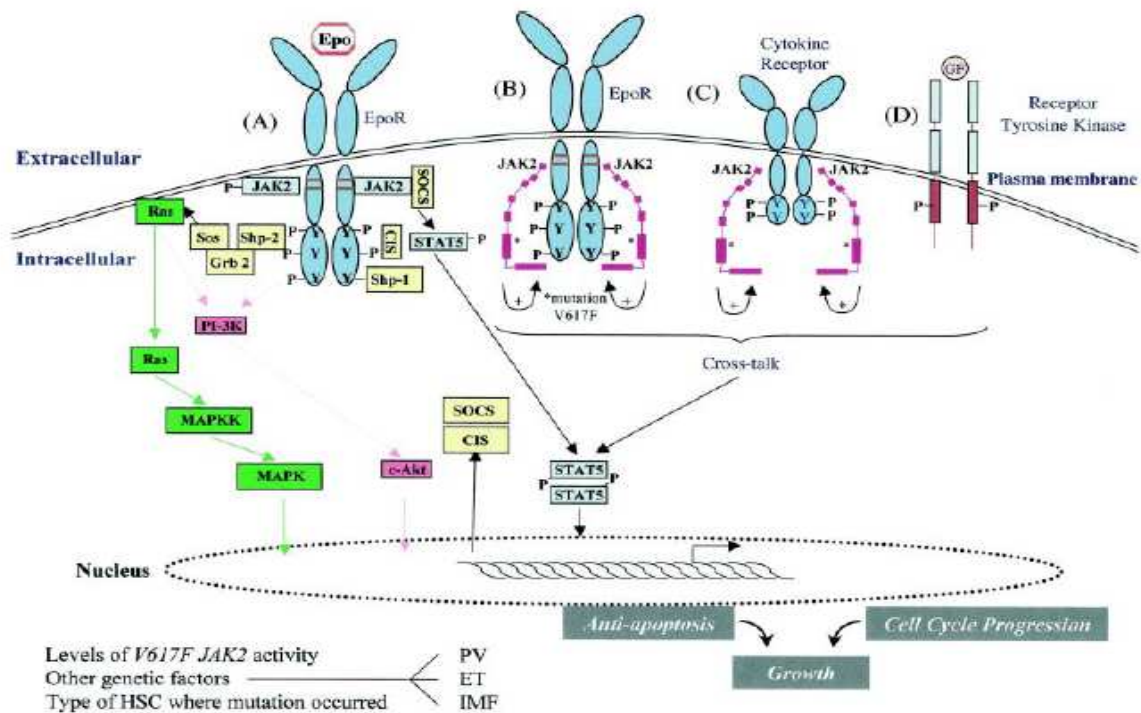
**Figura 2:** A) Esquema de activación de JAK2. B) Esquema de la estructura del gen *JAK2*, modificado de Goldman. NEJM 2005.

La activación de JAK2 en condiciones normales, se realiza a través de un receptor tirosín kinasa como el de la EPO o la TPO. Al unir este receptor el ligando específico, generan la autofosforilación cruzada de dos moléculas de JAK2 (figura 2A)<sup>21-23</sup>.

Dicha mutación afecta al dominio autoinhibidor pseudokinasa del gen *JAK2*, encargado de defosforilar JAK2 tras su activación. Produce la inactivación de dicho dominio, generando

la incapacidad de realizar la defosforilación, y por tanto, quedando JAK2 una vez fosforilado, constitutivamente activado (Figura 2B).

Tras la activación de JAK2, cada molécula se une a una de STAT<sup>24</sup> a través de su dominio SH2, produciendo la cascada de activación JAK-STAT. Así mismo JAK2 activa colateralmente otras vías como la vía MAPK a través de RAS, o la vía AKT a través de PI3K<sup>25,26</sup>, y así mismo la activación es regulada negativamente por la proteína SOCS<sup>27,28</sup>. La acción de todas estas vías activadas se resume en la progresión del ciclo celular, la acción anti-apoptótica y un aumento en la proliferación



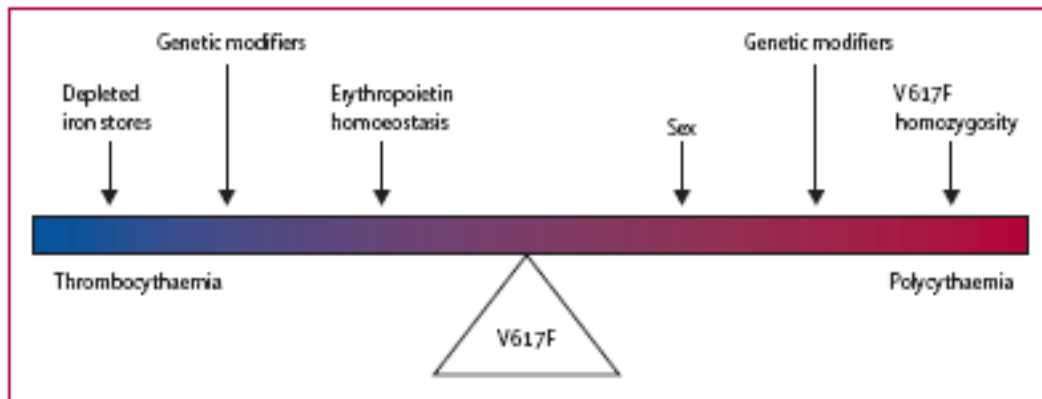
**Figura 3:** Esquema de activación del receptor de la EPO y cascadas de activación de JAK2, modificado de Vainchenker. ASH. 2005.

Cuando se genera la mutación *JAK2 V617F*<sup>29</sup>, el receptor tirosín kinasa no necesita ser activado mediante ligando ya que la molécula de JAK2 está constitutivamente activada, produciendo la cascada JAK-STAT de manera basal y todas las acciones anteriormente nombradas (Figura 3)<sup>30,31</sup>.





diverge entre la TE y la PV, con un papel preponderante de la carga mutacional de *JAK2 V617F*<sup>41</sup>. Esta teoría describe que bajas tasas de carga mutacional están asociadas a la TE, siendo una buena forma de explicar la coexistencia de TE en presencia y ausencia de la mutación, y explica porque la TE positiva posee una carga mutacional media de entre un 3-6% de *JAK2 V617F*<sup>42</sup>.

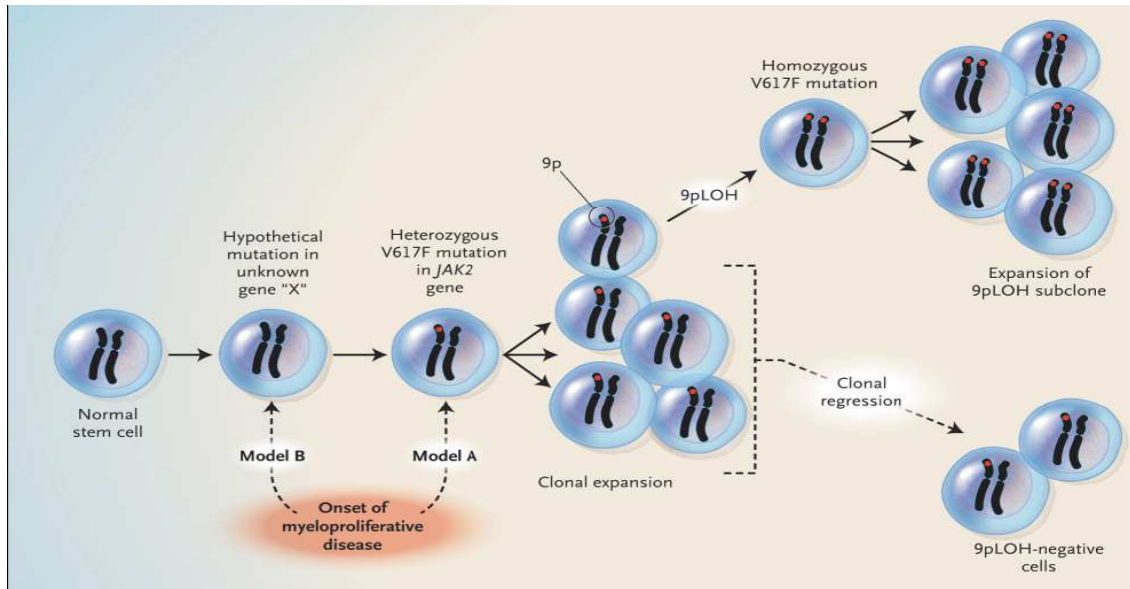


**Figura 5:** Esquema describiendo la teoría del *continuum*, modificado de Campbell. Lancet. 2005.

Por otro lado, niveles elevados de alelo mutado esta asociado al fenotipo de PV, donde la media de la carga mutacional se encuentra cercana al 20%. Esta hipótesis cuenta con dos sucesos no fáciles de explicar. El primero es aquellos pacientes con TE que poseen cargas mutacionales elevadas, por encima del 20% de cuantificación e incluso muy superiores.

El segundo problema es la estabilidad de la carga mutacional *JAK2 V617* en cada paciente, y en los pocos casos que sucede esta variación, como pudiese ser debido a una respuesta molecular al tratamiento citorreductor, reduciéndose la carga, no se observa un cambio de fenotipo patológico.

Lo que parece mas claro es que ya sea la mutación de *JAK2 V617*, así como otras alteraciones genéticas, o la combinación de ambas, promueve una expansión clonal. En la figura 6 el esquema que propone Kralovics son dos posibles modelos.



**Figura 6:** Posible papel de la mutación *JAK2* V617F en las NMPc, modificado de Kralovics. NEJM. 2005.

En el primero (A), la mutación en el cromosoma 9 del gen *JAK2* V617F, en solitario o junto otras alteraciones en un hipotético gen "x", produce el inicio de la patología mieloproliferativa. En el modelo B, la heterocigosidad de *JAK2* V617F sucede posterior al inicio del síndrome mieloproliferativo<sup>38,43-47</sup>, provocado por la alteración en el hipotético gen o genes "x". Las células que poseen heterocigosidad para la mutación *JAK2* V617F poseen ventaja proliferativa sobre las células wild-type. La recombinación mitótica, entre regiones homólogas de dos cromosomas 9 en células heterocigóticas para la mutación, produce la pérdida de heterocigosidad, siendo una de las células hijas homocigoto para la mutación ganando ventaja proliferativa adicional (Figura 6).

Tras el descubrimiento de la mutación *JAK2* en 2005, numerosos análisis genéticos han dilucidado nuevas alteraciones en las NMPc, como la mutación del exon 12 de *JAK2* (típica en las PV *JAK2* V617F negativas); la mutación del gen *MPL*<sup>48</sup>, propia del 5-10% de las TE, y generadora de un fenotipo trombocitémico en ratones<sup>49</sup>; o la mutación de la proteína adaptadora inhibitoria de JAK-STAT, LNK. De esta manera, se han descubierto numerosas alteraciones que ponen en entre dicho la importancia de la mutación de *JAK2*

*V617F* como evento principal y/o primario de las NMPc. Entre estas alteraciones se encuentran mutaciones en el gen *TET2*, *IDH1/2*, *EZH2*, y *ASXL1*, todos ellos implicado en la regulación epigenética<sup>50,51</sup>. Esto ha sugerido hipótesis tales como que dichas alteraciones son predecesoras de la mutación *JAK2 V617F*, ya que ellas facilitan una selección clonal, permitiendo la dominancia de los clones con la mutación de *JAK2 V617F* sobre los demás durante la fase crónica de la patología. Por otro lado, también parece aclarada la implicación de la delección de la transcripción de IKAROS en la progresión de las NMPc a LMA<sup>52</sup>.

### **Parte V: Estudios genéticos. Los análisis de *microarrays***

Una vez completada la secuencia del genoma humano, y con el avance en las técnicas de análisis masivo, el análisis de expresión génica por técnica de *microarray* se ha establecido como uno de los mejores métodos de “screening” en numerosas patologías, haciendo especial hincapié en las patologías neoplásicas. Numerosos estudios de este tipo han sido la base de la identificación de genes con funciones conocidas e implicados en el control del ciclo celular, el potencial oncogénico o la diferenciación celular.

El concepto *microarray* se ha extendido a otros campos y no sólo a la expresión génica, y ya es habitual encontrar numerosas referencias de estudios de metilación, SNPs o microRNAs utilizando soportes de *microarrays*. Dependiendo del tipo de *microarray* que se utilice, de expresión, de metilación o microRNAs la técnica puede variar ampliamente, siendo constante la necesidad de un soporte donde se producirán los miles de micro-ensayos, y donde cada micro-ensayo, corresponde a una secuencia/s, normalmente perteneciente a un gen.

## 1. *Microarrays* de expresión

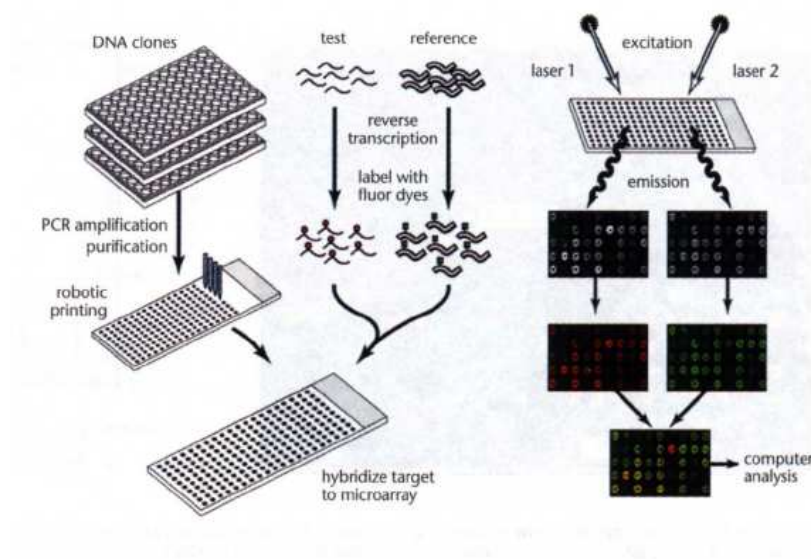
Existen 2 tipos de *microarrays* de expresión, los *microarrays* de oligos y los *microarrays* de cDNA. Ambos consisten en la impresión e inmovilización estable de ácidos nucleicos sobre un substrato, habitualmente cristal, previamente tratado químicamente. En el caso de los *microarrays* de cDNA se seleccionan una colección de clones de cDNA cuya secuencia es verificada, replicada y amplificada mediante PCR antes de su impresión. El objetivo de este tipo de *microarray* es valorar el transcriptoma celular a través de la semi-cuantificación de los niveles de mRNA. Los *microarrays* de oligos poseen la ventaja respecto a los de cDNA en la no necesidad de disponer de clones de cDNA, y que pueden detectar transcritos alternativos ya que pueden ser diseñados para cualquier región del gen. Su mayor desventaja es el alto coste y la necesidad de un análisis informático para definir las regiones específicas del gen para que la hibridación sea más específica.

Para la hibridación es necesario ácidos nucleicos correspondientes a una muestra problema, en el caso de *microarray* de oligos, cRNA (RNA complementario), el cual se marca con un fluoróforo, mientras que el cRNA de una muestra de referencia se marca con un fluoróforo diferente, típicamente los fluoróforos Cy5 (cianina-5) y Cy3 (cianina-3). Ambos elementos son hibridados y la fluorescencia emitida detectada con un escáner láser de alta resolución. Estas señales son medidas y procesadas a través de diferentes programas informáticos. La intensidad de la señal es el parámetro mas crítico en la reproducibilidad, especificidad y sensibilidad de la técnica, y por ello, para minimizar las fluctuaciones internas o externas de la técnica es importante aplicar procedimientos de calibración tal como la normalización. Con ello se ajusta las diferencias debidas a marcaje, detección de señales en dos diferentes canales de fluorescencia o cantidad de cRNA de las muestras.

La potencia del análisis de *microarrays* de expresión viene dado por el procesamiento bioinformático de sus resultados, generándose una huella molecular de las diferentes muestras a estudio. Se pueden utilizar análisis supervisados (se generan clusters o grupos de

muestras basado en criterios biológicos, clínicos, o de otro tipo pero previo a realizar la técnica de *microarray*) o no supervisado (se realizan clusters de las muestras según el patrón de expresión generado en el *microarray*). Para facilitar la interpretación de resultados se utilizan representaciones visuales de dicha huella en formato de matrices de genes y muestras con escalas colorimétricas que indican la mayor o menor expresión génica. Así mismo, son especialmente útiles los programas que interrelacionan las huellas moleculares de los diferentes genes en un contexto biológico como pueden ser los genes implicados en vías de señalización o pertenecientes a una misma familia<sup>53-55</sup>.

Esta técnica no tiene una aplicación directa, y tan sólo sirven como “screening” o cribado de genes candidatos a estudios con mayor sensibilidad o mayor potencia biológica. Son utilizados para observar los patrones diferenciales entre diversas poblaciones, desde un grupo de patologías semejantes, a una respecto a personas sanas, a la evolución de la misma en el tiempo, o el efecto de uno o más tratamientos sobre ella.



**Figura 7:** Esquema simplificado del protocolo de un *microarray* de expresión

Una vez se han seleccionado los genes candidatos, la metodología a seguir suele ser la validación de los mismos, normalmente, mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Si dicha

PCR lo compone un grupo de decenas a cientos de genes, la técnica que se realiza es la conocida como *macroarray*, cuya ventaja respecto al *microarray* es, que al no tratarse de una hibridación, no es una técnica semi-cuantitativa sino cuantitativa. La desventaja obvia es el número de genes a estudio, que se reduce de los más de 40.000 que se pueden estudiar en un *microarray* y de 100 a 1000 veces menos del *macroarray* (Figura 7).

## **2. *Microarrays* de metilación**

La detección y cuantificación de la metilación del DNA se ha convertido en una técnica común para el estudio de numerosas neoplasias, patologías genéticas u otros estudios biológicos. Existen diferentes métodos para dicho propósito, desde la electroforesis capilar de alto rendimiento a la PCR metil-sensitiva. Sin embargo, la técnica más utilizada para la cuantificación de la metilación del DNA es la técnica del bisulfito, la cual consiste en el tratamiento de dicho DNA con bisulfito, lo que produce el cambio de las citosinas no metiladas a uracilos, mientras que las citosinas metiladas no varían. Una vez generada esta conversión, el DNA se suele amplificar y fragmentar para su posterior hibridación. Una de las tecnologías que se utilizan para la hibridación en los *microarrays* de metilación son las “BeadChips”. Consiste en un *array* de silicona compuesto por 12 *sub-arrays*. Cada *array* individual consiste en 60.000 tipos diferentes de “BeadChips” con una secuencia en forma de oligonucleotido cada uno. Existen dos grandes tipos de “BeadChips”, uno para cada tipo de isla CpG, metilada (C) y no metilada (T). Tras la hibridación del DNA con los “BeadChips” se produce la extensión de los oligos y se marcan con citosina fluorescente. Por último se escanean utilizando un láser que excite los fluoróforos del producto amplificado y un escáner de alta resolución. En la figura 8 se puede observar un esquema simplificado de la metodología para la realización de un *microarray* de metilación

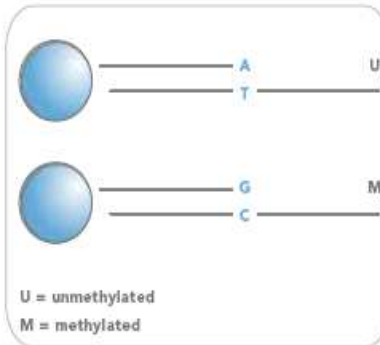
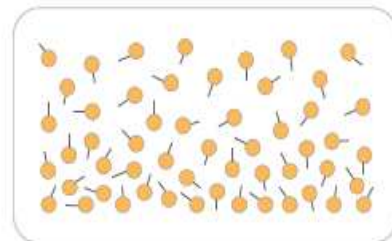
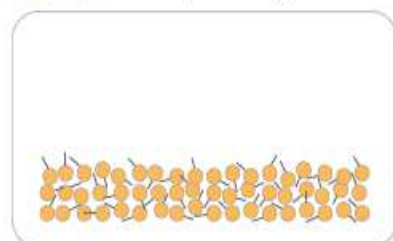
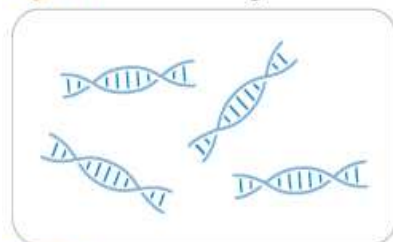
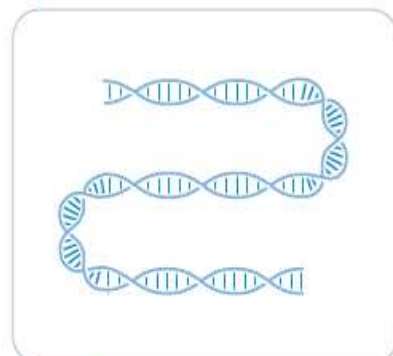
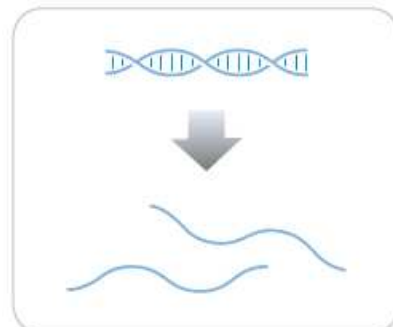
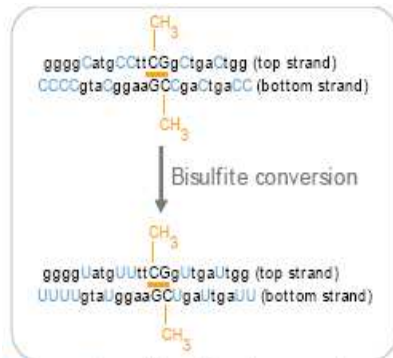


Figure 7 Hybridization of Bisulfite-converted gDNA

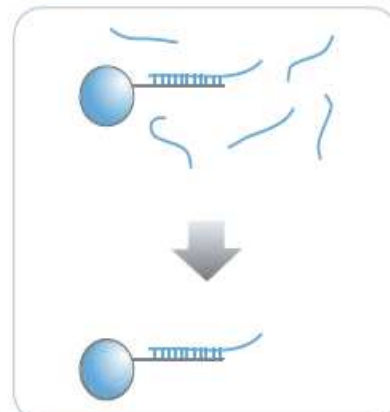


Figure 8 Washing BeadChip

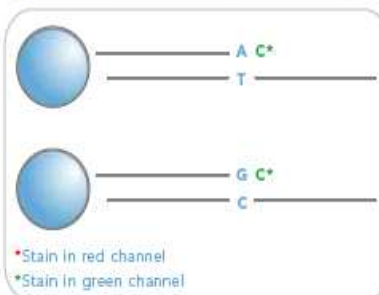


Figure 9 Extending and Staining BeadChip



Figure 10 Imaging BeadChip

Figura 8: Protocolo simplificado de procesamiento de un *microarray* de metilación (Illumina).

Los datos resultantes deben ser procesados a nivel bioinformático, apoyándose en programas de interpretación visual, de “clustering” y de análisis de muestras independientes.

Al igual que sucede en los *microarrays* de expresión, los resultados de un *microarray* de metilación deben ser validados mediante una técnica cuantitativa como puede ser la pirosecuenciación o el “high resolution melting” para metilación.

### **3. Microarrays de microRNAs**

Los denominados “*microarrays* de microRNAs” son realmente soportes muy similares a los que hemos denominado anteriormente “*macroarrays*”. Se tratan de tarjetas microfluídicas con cientos de pocillos, cada uno correspondiente al ensayo necesario para amplificar un gen (en este caso, correspondiente a un microRNA) por PCR cuantitativa en tiempo real.

La única diferencia entre un “*macroarray*” habitual y un “*microarray* de microRNAs” estriba en que el cDNA utilizado ha debido ser retrotranscrito de una manera específica que permita la síntesis simultánea para formas maduras de miRNAs.

### **4. Estudios de *microarrays* en NMPC**

Existen diversos estudios de perfil de expresión génica en este conjunto de patologías con la intención de conocer los mecanismos moleculares subyacentes a las mismas.

Pellagatti y colaboradores fue el primer investigador que utilizó esta técnica aplicada a las NMPC, con 20 muestras patológicas totales, pero centrándose en la Policitemia Vera<sup>56</sup>. Utilizando un *microarray* de cDNA y posterior validación por PCR cuantitativa en tiempo real, este autor encuentra una serie de genes candidatos sobre-expresados en la Policitemia Vera, relacionados con funciones biológicas tales como la apoptosis, señales de transducción o factores de transcripción, como *P38*, *FCER1G*, etc. pudiendo estar implicados en esta patología.



Sin embargo fueron Kralovics y colaboradores los que presentaron un trabajo con mayor impacto, un par de años después y con un tamaño muestral mayor (98 muestras patológicas de NMPc). Encontraron 14 genes como *NF-E2* diferencialmente expresados en PV que podían estar interrelacionados con la vía JAK/STAT, y estos resultados fueron validados mediante estudios funcionales<sup>9</sup>. En esta misma línea de investigación, Goerttler y colaboradores combinaron estudios de *microarray*, con validación por PCR cuantitativa en tiempo real, y complementado con estudios proteómicos y funcionales, lo que les llevó a confirmar los resultados del estudio de Kralovics<sup>57</sup>.

Otros estudios de interés son tanto el de Schwemmers y colaboradores<sup>58</sup> y Puigdecanent y colaboradores<sup>59</sup>, donde se centran en la patología de la Trombocitemia esencial, y concretamente, en discernir diferencias entre la TE *JAK2 V617F* positiva y negativa.

En ambos casos la metodología es similar, la utilización de un *microarray* de oligos en aproximadamente 40 muestras patológicas, del cual extraen una serie de genes candidatos y son validados mediante técnica de PCR cuantitativa en tiempo real.

En ambos casos se obtuvieron una serie de genes candidatos tales como *FOSB*, *CISH*, *TNF-alpha*, *TNFAIP6* o *PIM-1* con diferencias significativas entre ambas poblaciones.

Los estudios de *microarrays* tanto de metilación como de microRNAs en NMPc son bastante escasos. En el campo de los microRNA, Bruchova y colaboradores han sido pioneros<sup>60</sup>, y más recientemente Slezak y colaboradores<sup>61,62</sup>. En dichos estudios identifican una serie de microRNAs y son validados por PCR cuantitativa en tiempo real relacionado con eritropoiesis, procesos inflamatorios u otras funciones biológicas que pudiesen estar implicadas en NMPc.

Todos estos estudios no han conseguido tener respuestas resolutivas a las grandes preguntas de las NMPc, el origen de las mismas y la divergencia entre ellas. Sin embargo han sido una importante herramienta a la hora de generar nuevas líneas de investigación, y proponer nuevos modelos biológicos sin partir de datos previos.

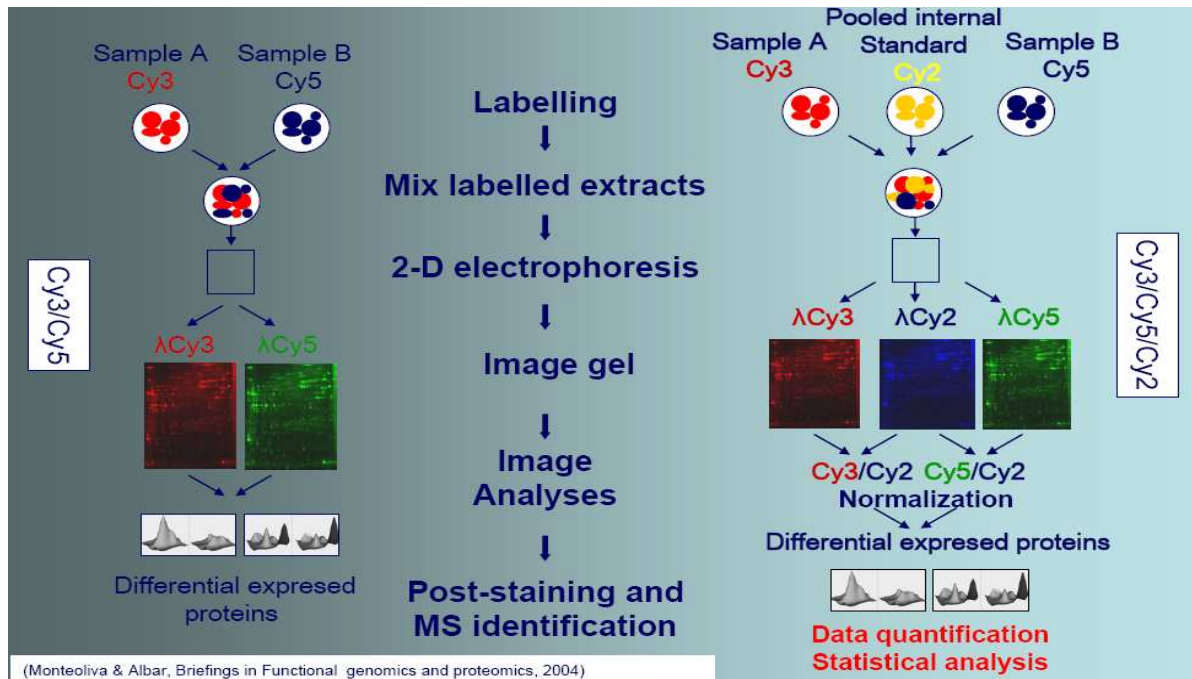
## **Parte VI: Estudios proteómicos. Los geles DIGE y la espectrometría de masas**

Aunque los estudios masivos en genómica supusieron una revolución para el screening de numerosas patologías, se observó la necesidad de una prolongación biológica de este tipo de investigaciones con estudios funcionales y proteómicos debido al mayor grado de complejidad que entraña el genoma humano por sí sólo<sup>63</sup>.

Sin embargo, se han intentado idear metodologías que realizaran este tipo de “screenings” a estos niveles, y concretamente a nivel proteómicos se han generado diversas técnicas enfocadas a dicho fin. Una de ellas ha sido los *arrays* de proteínas, pero poseen el inconveniente del número de proteínas que se pueden estudiar a la vez (en el rango de decenas a cientos de proteínas). Sin embargo, mediante el uso de la tecnología de las electroforesis bidimensionales se ha conseguido el análisis del proteoma completo de las muestras problema. En este campo, se ha dado un paso más con la técnica del DIGE (differential in gel electrophoresis), que consiste en el marcaje de las proteínas con un fluoróforo (comúnmente, Cy5, Cy3 y Cy2) y la realización posterior de un gel bidimensional (Figura 9). Se utiliza un fluoróforo para cada una de las dos poblaciones de muestras que se desean comparar, y se puede incluso introducir una serie de patrones marcados con un tercer fluoróforo para normalizar los resultados. Se realiza un procesamiento de la imagen de los diferentes geles y se analizan de manera bioinformática para detectar aquellos puntos diferencialmente expresados. La técnica DIGE tiene una ventaja adicional, y es que su capacidad de resolución es capaz de distinguir una misma proteína con diferentes modificaciones epigenéticas (metilaciones, acetilaciones, fosforilaciones, etc.) como diferentes puntos, y por tanto, se puede comparar no sólo los diferentes tipos de proteínas sino el estado de las mismas en las diferentes poblaciones a estudio.

Una vez detectados estos puntos, que corresponde cada uno a una proteína diferente, deben ser identificados, para lo cual puede ser utilizada la espectrometría de masas.

Como ocurría en los *microarrays*, esta técnica es útil como screening, y ha de ser validada a través de la técnica de Western Blot (WB), citometría de flujo (CMF) o ELISA, o complementada con estudios funcionales.



**Figura 9:** Esquema simplificado de un protocolo de DIGE con dos y tres fluoróforos.

## 1. Estudios DIGE/MS en NMPc

Al tratarse de una metodología relativamente reciente, existen pocas referencias que relacionen esta técnica y las NMPc. Una de ellas es la de Mossuz y colaboradores, el cual realiza la búsqueda de proteomas diferencialmente expresados en suero de muestras de TE positiva y negativa. Sin embargo, el suero, no es el mejor material biológico que debe utilizarse en este tipo de estudios al encontrarse ciertas proteínas a unas concentraciones muy elevadas y poder apantallar la expresión diferencial de otras proteínas menos concentradas. Esta puede ser una de las causas a la ausencia de resultados positivos<sup>64</sup>.

## **2. Fundamentos**

El objeto del presente estudio es estudiar las divergencias moleculares entre la PV y la TE que profundicen en la fisiopatogenia de ambas patologías y propicien el hallazgo de nuevos biomarcadores para uso clínico y diagnóstico, así como dianas terapéuticas desconocidas.

### **HIPOTESIS**

- 1.- Existen alteraciones moleculares diferentes a la alteración de la vía JAK2/STAT que justifican las diferencias fenotípicas entre Policitemia Vera y Trombocitemia Esencial.
- 2.- Estas nuevas alteraciones moleculares podría ser un criterio diagnóstico y/o una diana farmacológica para el tratamiento de las NMPc phi negativas.

### **OBJETIVOS**

#### **Objetivos generales:**

- 1.- Establecer un modelo molecular de la fisiopatogenia de la Policitemia Vera y la Trombocitemia Esencial *JAK2 V617F* positiva y negativa, y delimitar las diferencias entre las bases moleculares de los diversos fenotipos patológicos.
- 2.- Buscar nuevas dianas farmacológicas y biomarcadores para la Policitemia Vera y la Trombocitemia Esencial.

**Objetivos específicos:**

- 1.- Analizar y validar el patrón de expresión genética, expresión proteica, y epigenética de las patologías Policitemia Vera y Trombocitemia Esencial *JAK2 V617F* positiva y negativa.
- 2.- Confirmación a nivel funcional la importancia de estas proteínas candidatas en un modelo de NMPc.
- 3.- Evaluación pre-clínica *ex-vivo* del efecto de drogas específicas frente a las posibles dianas terapéuticas observadas en los estudios.

### **3. Materiales y Métodos**

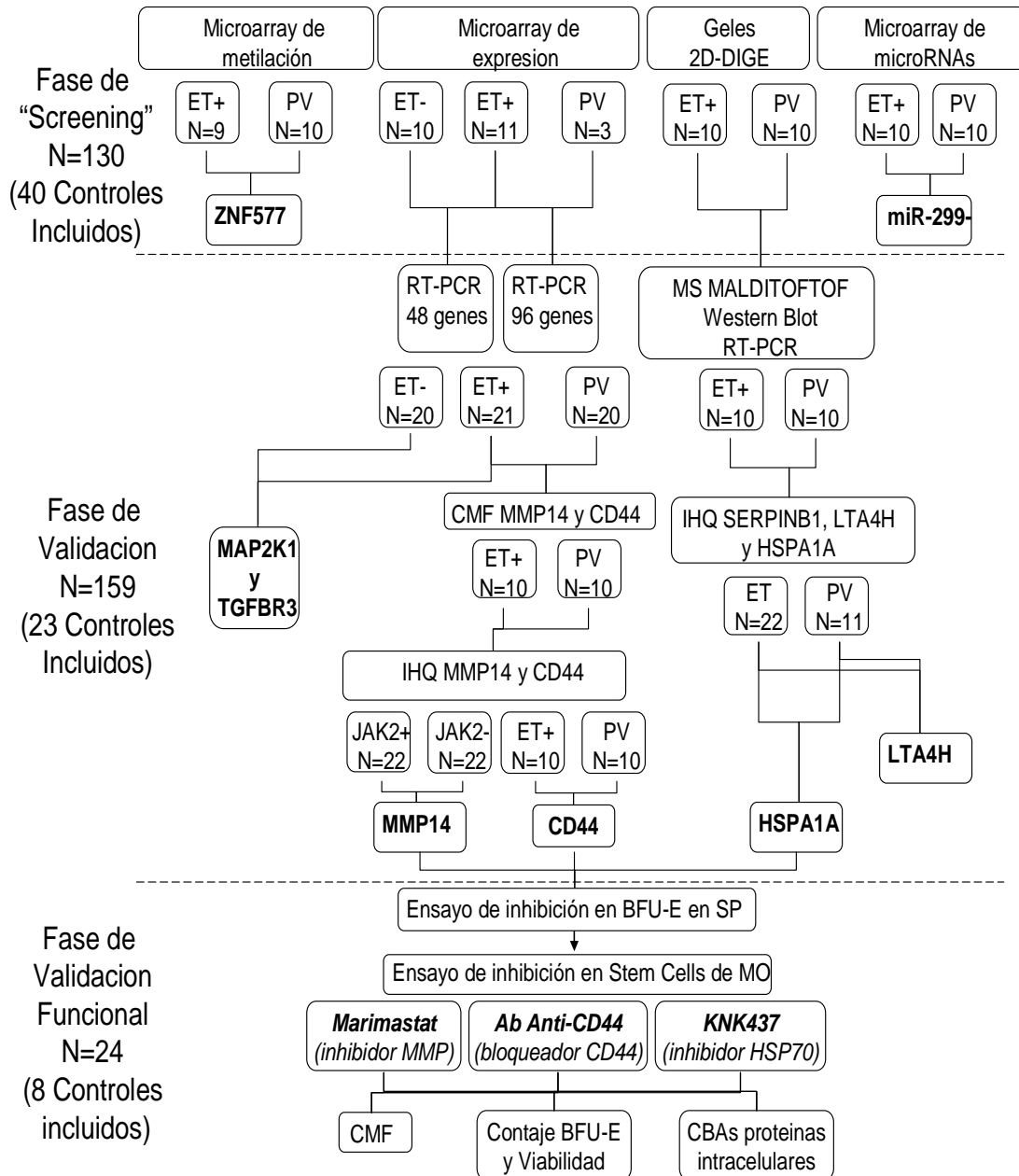
#### **Parte I: Muestras y pacientes**

El conjunto de estudios incluye 106 muestras pacientes diagnosticados de Policitemia Vera, 105 muestras de Trombocitemia Esencial *JAK2 V617F* positivas y 43 muestras de Trombocitemia Esencial *JAK2* negativa (Figura 10). El diagnóstico de TE o PV se estableció siguiendo los criterios de la OMS correspondientes al año en que fueron diagnosticadas en el centro de procedencia de las muestras: Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, Hospital del Mar de Barcelona, Hospital Infanta Leonor de Madrid, Hospital Virgen de la Salud de Toledo, Hospital Severo Ochoa de Madrid, Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid y Hospital Universitario Clínico San Carlos de Madrid.

El criterio de selección en cada estudio fue cumplir los criterios de diagnóstico y la disponibilidad de las muestras adecuadas para cada estudio: cDNA en el caso de los *microarrays* de expresión y microRNA, y su validación por PCR cuantitativa en tiempo real; DNA en el caso del *microarray* de metilación; proteínas en el caso de los estudios de DIGE; biopsias de médula ósea en el caso de los estudios de inmunohistoquímica (IHQ); células mononucleadas y células madre hematopoyéticas en el caso de los estudios funcionales.

Se obtuvieron los datos clínicos a través de la revisión de las historias de los pacientes, con la colaboración de los servicios de los diferentes hospitales implicados.

Los estudios se complementaron con 71 individuos sanos utilizados como controles, 20 trombocitosis secundarias y 8 eritrocitosis secundarias, estas últimas, diagnosticados a través de su historia clínica.



**Figura 10:** Diagrama de flujo a modo de resumen del recorrido metodológico utilizado en la presente tesis.

Se estudiaron las siguientes muestras de pacientes, desglosados por técnicas:

-*Microarray* de expresión: 54 muestras (11 TE positivas, 10 TE negativas, 3 PV, 10 trombocitosis secundarias y 20 donantes sanos repartidos en 4 "pools" de 5 cada uno).

-*Macroarray* de 48 genes: Se utilizaron un total de 41 muestras, 11 TE positivas, 10 TE negativas, 10 donantes sanos en dos "pools" de cinco controles y 10 trombocitosis secundarias en dos "pools" de cinco muestras cada uno.

-*Macroarray* de 96 genes: Se analizaron 58 muestras totales, 20 PV, 20 TE positivas, 8 eritrocitos secundarias en dos “pools” de 4 muestras y 10 donantes sanos en dos “pools” de cinco muestras cada uno.

-RT-PCR de ensayos individuales TaqMan: 20 muestras de NMPc se analizaron, 10 PV y 10 TE positivas, con la adición de 10 donantes sanos.

-*Microarray* de metilación: 47 muestras de pacientes fueron utilizadas para la realización de un *microarray* de metilación, 12 PV, 11 TE positivas, 12 TE negativas y 12 donantes sanos utilizados como controles.

- *Microarray* de miRNAs: Se analizaron 27 muestras de NMPc, 9 PV, 9 TE positivas y 9 TE negativas.

-Gel 2D-DIGE y MS: 30 muestras en total fueron analizadas por tecnología de geles 2D DIGE y espectrometría de masas, 20 de ellas NMPc: 10 PV y 10 TE *JAK2 V617F*, junto con 10 donantes sanos utilizados como controles.

-Western Blot: Se validaron las proteínas candidatas en una cohorte de 24 muestras, 8 PV, 8 TE positivas y 8 controles de las 30 totales utilizadas para el análisis de geles 2D-DIGE/MS.

-Citometría de flujo: 20 casos de NMPc fueron utilizados, 10 PV y 10 TE positivas.

-Inmunohistoquímica: Se utilizaron 55 biopsias de médula ósea de 11 pacientes de TE positivas, 11 TE negativas, 11 de PV, 11 de MFP, y de 11 pacientes con médulas sin hallazgos específicos utilizados como controles.

-Cultivos celulares: Se utilizaron 8 muestras de PV y 8 muestras de TE de células mononucleadas procedentes de sangre periférica para estudios de cultivos de colonias eritroides, además de 3 donantes sanos como controles. Así mismo se utilizaron 2 muestras de PV y 2 muestras de TE de células madre hematopoyéticas CD34+ procedentes de médula ósea para estudio de cultivos de progenitores, y de 2 muestras de CD34+ procedentes de cordón umbilical como controles.



## **Parte II: Análisis de expresión génica**

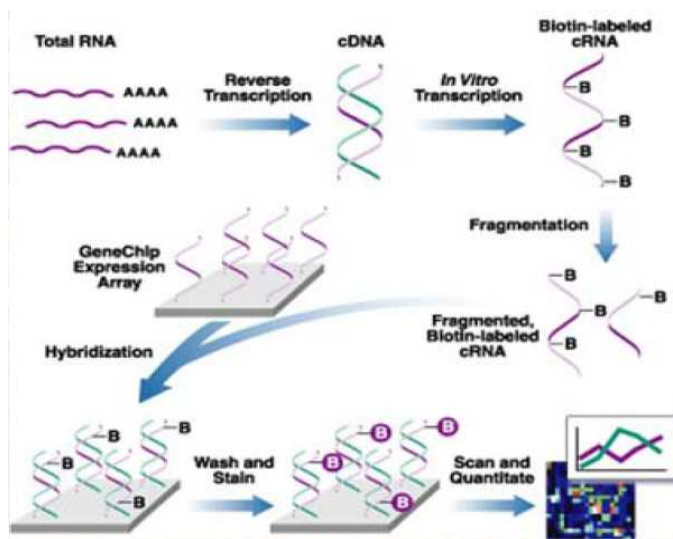
### **1. *Microarray* de expresión**

Se utilizó RNA (para el *microarray*) perteneciente a los neutrófilos de sangre periférica extraído en tubos con EDTA de los pacientes estudiados. La extracción de neutrófilos se realizó mediante la técnica de gradiente de densidad de Ficoll-Paque (Pharmacia, Mannheim, Alemania)<sup>65</sup>. Los eritrocitos fueron eliminados mediante una lisis con un buffer comercial (Red Blood Lysis Buffer, de Roche Applied Sciences, Mannheim, Alemania). El RNA fue extraído a partir de una cantidad aproximada  $1 \times 10^6$  y con una pureza cercana al 90%, mediante el uso del TRIzol(R) (Invitrogen Life Technologies, NY, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se descartó contaminación linfocitaria (menos del 2 %) mediante citometría de flujo. La calidad del RNA fue supervisada mediante nano-electroforesis utilizando el Nano lab-on-a-chip assay para RNA total eucariótico (Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, USA). El RNA se retrotranscribió a cDNA mediante la enzima MMLV-modificada, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA). Por último, por transcripción *in vitro* del cDNA se obtiene cRNA (RNA complementario) mediante el kit Megascript T7 (Ambion, NY, USA), amplificándose entre 10-500 veces la secuencia.

La técnica del *microarray* de expresión fue realizada en la unidad de linfomas del CNIO. El perfil de expresión por *microarray* se obtuvo utilizando el “Whole Human Genome Oligo Microarray Kit” (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). La hibridación se realizó junto a un mix de líneas celulares tumorales cuyo nombre comercial es Stratagene Universal Human Reference RNA (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

Por cada 2 µg de RNA total fue mezclado con 2 µL de una dilución 1/5 del producto Agilent's Two-Color Spike-in RNA control. La mezcla fue amplificada con kit de amplificación de RNA (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) y marcada con Cy3,

estando marcada la de referencia con Cy5. Cada muestra fue medida con el Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Newark, USA) para verificar su cantidad e integridad. Las muestras marcadas y amplificadas fueron hibridadas en un horno giratorio sobre el soporte Agilent 44K human whole genome microarrays, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las imágenes fueron escaneadas con el G2565BA Microarray Scanner System (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) (Figura 11).



**Figura 11:** Esquema simplificado del protocolo utilizado para el *microarray* de oligos.

## 2. *Macroarray*, PCR cuantitativa en tiempo real

Se procesaron dos modelos de tarjetas microfluídicas (LDA), una de 96 genes y otra de 48. Los genes introducidos en las tarjetas microfluídicas fueron seleccionados mediante los resultados de *microarrays* (84/96 en el primer modelo, y 47/48 en el segundo), complementados con genes de interés biológico o funcional desde el punto de vista bibliográfico, y genes control (*GAPDH*, *18s rRNA* y *ABL1*, utilizando este último para el análisis de resultados en el caso del primer modelo de tarjeta, y *GAPDH* en el caso del segundo modelo). Así mismo, se añadieron 4 genes en formato de ensayo individual TaqMan (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) de interés biológico y/o funcional.



**Figura 12:** Tarjeta de *macroarray* LDA (izquierda) y equipo ABI PRISM 7900 HT (derecha).

El material biológico utilizado para esta técnica es cDNA de neutrófilos de sangre periférica, y la RT-PCR fue realizada por duplicado en el ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) (Figura 12).

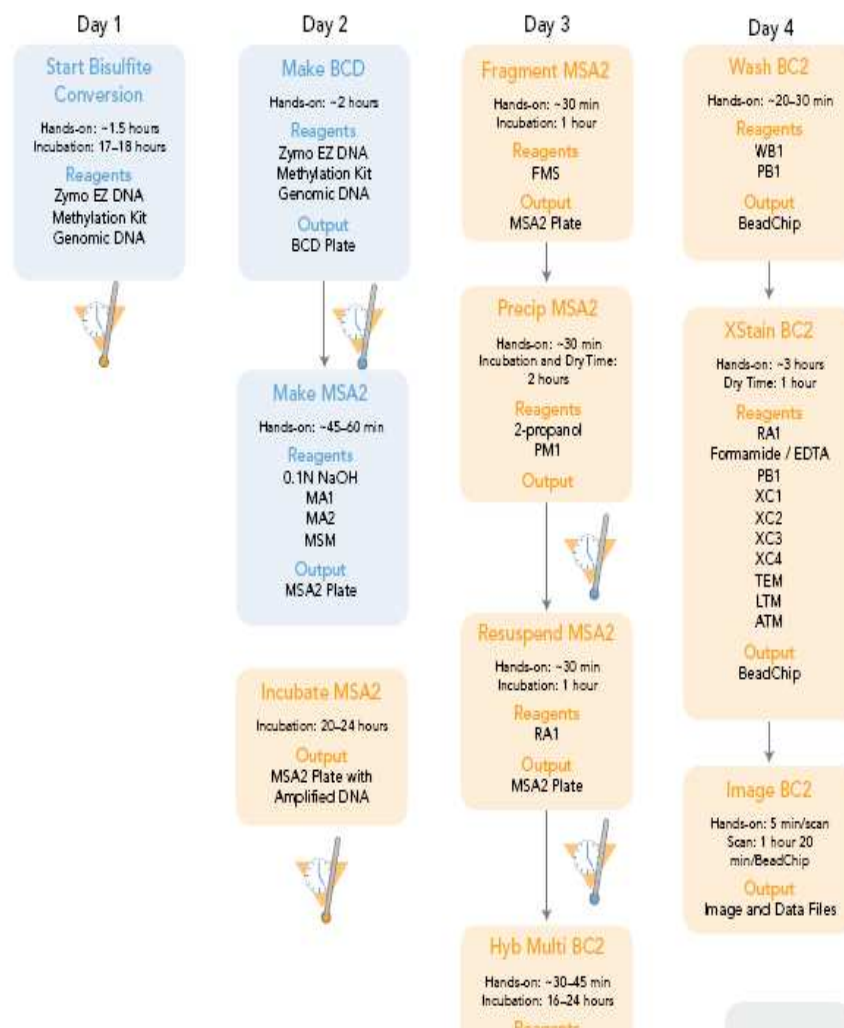
### **3. PCR cuantitativa en tiempo real de ensayos TaqMan**

Se realizó la RT-PCR de genes adicionales no presentes en las tarjetas microfluídicas con un interés biológico y/o funcional o genes dentro de las TLDs de los que se deseó ampliar la población a estudio, o con motivo de validación de otras técnicas utilizadas: HSPA1A, FOSB y CISH. La metodología fue exactamente idéntica a la utilizada para las tarjetas TLDs, ya que estas tarjetas utilizan la misma tecnología de sondas de hibridación de los ensayos TaqMan.

### **Parte III: Análisis de metilación**

Se utilizó DNA de sangre periférica extraída en tubos de EDTA, mediante la utilización del Maxwell 16 SEV automated extraction system (Promega).

La cantidad y calidad del DNA fue medida mediante el Nanodrop ND-1000 ((NanoDrop Technologies, Newark, USA). En la figura 13 se observa el flujo de trabajo de un *microarray* de metilación Infinium de Illumina.



**Figura 13:** Esquema de trabajo del ensayo de metilación Infinium.

La técnica se realizó en la unidad de genotipado humano (CEGEN) del CNIO.

- Se procesó el DNA mediante la conversión con bisulfito mediante el uso de EZ-96 DNA Methylation Kit™ (Zymo Research, CA, USA). Posteriormente este DNA se amplificó, fragmentó, hibridó con ayuda de la tecnología de las BeadChips y se marcó siguiendo las instrucciones del fabricante (Illumina Inc., CA, USA).

Se obtuvo la imagen tras el escaneado y se procesaron los datos obteniendo una matriz de los mismos con la que trabajar mediante el programa GenomeStudio (Illumina Inc, CA, USA.).

#### **Parte IV: Análisis de microRNA**

Se procesó un modelo de tarjeta microfluídica (LDA) TaqMan con un total de 364 microRNAs denominados como “comunes”. Se utilizó como control uno de los microRNAs procesados cuya expresión es muy estable, el miRNA housekeeping MammU6. Como dato a destacar, es importante saber que se utilizó al igual que la RT-PCR convencional, cDNA como material biológico, pero que para su obtención se realizó una retrotranscripción específica del RNA para la obtención de mayor cantidad de miRNAs mediante el kit Megaplex (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA).

El proceso post-retrotranscripción fue realizado en el Servicio de Hematología del Hospital del Mar de Barcelona.

#### **Parte V: Análisis proteómico**

##### **1. Geles 2D y espectrometría de masas**

Se agruparon las 10 muestras de cada tipo en 1 sólo “pool”, obteniendo 3 “pools”: “Pool” PV, “Pool” TE positiva y “Pool” Controles.

Se utilizaron extractos de proteínas de la fracción citosólica extraídos mediante el kit ProteoExtract™ Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem, Darmstadt, Alemania) a partir de neutrófilos separados de sangre periférica mediante la técnica de gradiente de densidad de Ficoll-Paque (Pharmacia, Mannheim, Alemania)<sup>65</sup>. Los eritrocitos fueron eliminados mediante una lisis con un buffer comercial (Red Blood Lysis Buffer, de Roche

Applied Sciences, Mannheim, Alemania). Los extractos proteicos fueron enviados a la unidad de proteómica del CNB donde fueron procesados.

20 microgramos de cada PV y TE fueron minimamente marcados con 160 pmoles de esteres fluorescentes de N-Hydroxysuccinimida de Cy3 y Cy5 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Un pool como estándar interno fue realizado mezclando a partes iguales todas las muestras con 160 picomoles de Cy2. La reacción de marcaje fue realizada en oscuridad 30 minutos, y “*quencheado*” con Lysina 10 mM durante 10 minutos. Tanto las fracciones de las proteínas unidas de PV y TE como los estándares internos fueron combinados por pares, diluidos en “Rehydration buffer” (7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 10 mM DTT y 0.5% de amfolitos pH 3-11 NL), cargando las tiras de 18 cms de IPG pH 3-11NL (GE, Healthcare, Piscataway, NJ, USA), previamente rehidratadas con 340 ml de “Rehydration Buffer” con 1.2% de DeStreak en vez de DTT. La primera dimensión se corrió a 0.05 mA/tira de IPG en IPGphor IEG System (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) aumentando el voltaje en 5 pasos, 300 v/h durante 3 horas, un gradiente linear hasta 1000 v/h durante 6 horas, un gradiente linear de 8000 v/h durante 3 horas, y de 8000 v/h hasta 43000 Vhrs. Las tiras fueron equilibradas en oscuridad con “SDS Equilibration Buffer” (75 mM Tris pH 8,8, 6M urea, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS y trazas de azul bromofenol, conteniendo 1% (v/v) DTT durante 10 minutos y posteriormente en “SDS Equilibration Buffer” 4% (w/v) de iocoacetamida durante 10 minutos. Por último, las proteínas fueron separadas utilizando geles de 12.5% tris-glycine utilizando el dispositivo Ettan Dalt Six (GE, Healthcare, Piscataway, NJ, USA) a 20°C.

Tras la electroforesis, los geles 2D fueron escaneados con el scanner Typhoon 9400 (GE, Healthcare, Piscataway, NJ, USA) a resolución de 100 dpi y utilizando los filtros y longitudes de onda apropiados para cada fluoróforo. Se cuantificó la intensidad de proteína con el software deCyder v7.0. Primero, el modulo DIA (Differential in-gel Analysis) fue utilizado para co-detectar las 3 imágenes de cada gel (2 muestras y los estandares) y mediar

con fiabilidad los spots de Cy3 y Cy5, respecto a los estándares de Cy2. Se realizó una eliminación del background, cuantificación y normalización de las imágenes. Fueron individualmente procesadas mediante el modulo DIA y fueron “*matcheados*” entre los geles utilizando el modulo BVA (Biological Variation Analysis). Las diferencias fueron calculadas mediante el promedio de los ratios de cada spot. Se aplicó un t-test comparando el promedio de los ratios de cada spot para la muestra de PV y de TE, considerando significativo con p-valor < 0.05.

Tras el análisis de las imágenes, los geles fueron fijados en 50% metanol y 7% de ácido acético por 30 minutos y se incubó toda la noche en oscuridad con Sypro-Ruby (Invitrogen, NY, USA). Las imágenes teñidas con Sypro-Ruby fueron adquiridas con el scanner Typhoon, y comparadas con los anteriores escaneados con el programa DeCyder. Las coordenadas de cada spot de interés fueron automáticamente calculadas y los spots extraídos mediante el Ettan SpotPicker Robot (GE. Healthcare, New Port, NY) depositando en placas de 96 pocillos y procesado automáticamente mediante el Proteineer DP (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania).

Por último se procedió a la identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas.

El protocolo de digestión esta basado en la técnica de Schevchenko *et al*<sup>6</sup>.

Para el análisis MALDI-TOF/TOF, las muestras fueron automáticamente adquiridas en el espectrómetro de masas ABI4800 MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA), en modo de de reflector iónico positivo (aceleración iónica con voltaje sobre 25 kV para la adquisición de MS y 1 kV de MS/MS) y los espectros fueron almacenados en el ABI 4000 Series Explorer Spot Set Manager. Los espectros de los fragmentos de huella peptídica y de MS/MS fueron corregidos a base cero utilizando el ABI 4000 Series Explorer Software v3.6.

Cada espectro de huella peptídica fue calibrado respecto a las señales peptídicas de tripsina y keratina, y los picos correspondientes a las masas de estas proteínas fueron eliminados.

Por último los resultados fueron analizados bioinformaticamente mediante el programa Mascot v2.1. (Matrix Science, London, UK).

## **2. Western Blot**

Se realizaron 2 geles SDS-PAGE con 24 (12 en cada gel) de las 30 muestras estudiadas por geles 2D-DIGE. Se utilizaron los soportes para electroforesis SDS-PAGE Electrophoresis Module (Bio-RAD, NY, USA). Se cargó la misma concentración de proteína por pocillo (20-30 µg) y se introdujo en la cubeta con tampón de electroforesis (0.1% SDS en Tris/Gly 1X, PH 8.3). Se corrió durante 15 minutos aproximadamente a 100V, y una vez las muestras estaban inmersas en el gel separador el voltaje fue incrementado a 180V durante 30 minutos. Una vez finalizada, se procedió a la transferencia de la membrana de nitrocelulosa. Se realizo el montaje del sándwich y se introdujo en la cubeta con tampón de transferencia (20% v/v metanol, 250 mM tris, 1,92M Gly), y se corrió durante 2 horas a 100V.

Tras finalizar, las membranas fueron lavadas con PBS-T (PBS 0.1% Tween), y bloqueadas con tampón de bloqueo durante 1 hora (5% m/v de leche desnatada en polvo en PBS-T)

Para la incubación se utilizaron 2 µl de anticuerpo 1° anti-HSPA1A hecho en ratón (R&D, Minneapolis, MN, USA), 2.5 µl de anticuerpo 1° anti-SERPINB1 hecho en conejo (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania), 25 µl de anticuerpo 1° anti-LTA4H hecho en conejo (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania), 5 µl de anti-Pan-Actina y 50 µl de anti-ABL hecho en conejo (Cell Signaling, Beverly, MA, USA), todos ellos diluidos en 10 µl de tampón de lavado (PBS-T 0.1% leche en polvo). Se incubó durante 1 hora y se lavaron las membranas 3 veces con tampón de lavado, para posteriormente incubar con 5 µl de anticuerpo anti-conejo (Cell Signaling, Beverly, MA, USA), con excepción de la incubación con anti-



HSPA1A, que se incubó con 1 µl de anticuerpo anti-ratón (R&D, Minneapolis, MN, USA).

Se revelaron los resultados en un film mediante el kit ECL Plus o ECL Advance dependiendo de la intensidad (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK).

El control de carga Actina fue desechado, ya que había indicios de expresión diferencial en las poblaciones a estudio observado en los resultados de la técnica de gel 2D-DIGE. En su lugar, se utilizó la normalización respecto a proteína total (valorada por Lowry) y respecto a la proteína ABL.

### **3. Citometría de flujo**

Se realizó el análisis de la proteína CD44 mediante citometría de flujo sobre la subpoblación granulocítica a partir de células totales de las 20 muestras de NMPc. Se extrajeron las células totales de sangre periférica mediante la lisis de eritrocitos utilizando el reactivo Red Blood Lysis Buffer (Roche Applied Sciences, Mannheim, Alemania). Una vez lisados los eritrocitos, y tras agitación y centrifugación para su eliminación, se lavaron con solución salina. Se generaron tres tubos con la misma cantidad de células por muestra (aproximadamente 1-2 millones), uno blanco (con anticuerpo de control de isotipo) y otros 2 con los anticuerpos utilizados por separado. Se utilizó por tubo 10 µl de monoclonal anti-CD45-PerCP (BD Biosciences Europe, Oxford, UK) y 10 µl de CD-44-APC (BD Biosciences Europe, Oxford, UK). Se utilizó un anticuerpo IgG kappa-APC como control de isotipo. Tras incubación en oscuridad de 20 minutos y la eliminación por centrifugación del anticuerpo sobrante y resuspenderlo en PBS, se procesaron las muestras en un citómetro de flujo FACSCalibur de 4 canales (BD Biosciences Europe, Oxford, UK). Se adquirieron 50.000 células en la ventana propia de granulocitos respecto a tamaño/complejidad. Se realizaron tres ventanas según la intensidad de fluorescencia de CD44, total, baja ( $10^2$ - $10^3$ ) y alta ( $10^3$ - $10^4$ ). Se utilizó la media geométrica y se utilizó la fórmula “Media geométrica muestra/Media geométrica blanco para analizar los resultados.

Así mismo también se dividió en tres diferentes grados de expresión (bajo, alto, y total) y se analizó el % de células encontrados en estos diferentes grados de intensidad. Se analizaron todos estos datos por estadístico de Mann-Whitney y por comparación de medias, siendo significativo con un p-valor < 0.05.

#### **4. Inmunohistoquímica**

La técnica de IHQ fue realizada en el departamento de anatomía patológica del hospital 12 de octubre.

Todas las biopsias fueron obtenidas de pacientes al diagnóstico previo al tratamiento. Se analizaron las proteínas MMP14, CD44, HSPA1A, SERPINB1 y LTA4H mediante el marcaje con anticuerpos primarios frente a estas proteínas. Se montó la IHQ con los siguientes anticuerpos, frente a HSPA1A (MAB1663 anti h/m/r/rHSP70, dilución 1:8000; R&D, Minneapolis, MN, USA), SERPINB1 (HPA018871 Anti-SERPINB1, dilución 1/1200, Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania), LTA4H (HPA00399 Anti-LTA4H, dilución 1/50, Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania), CD44 (MAB7045 Anti-CD44, dilución 1/8000, R&D, Minneapolis, MN, USA) y MMP14 (MAB918 Anti-MMP14, dilución 1/1000, R&D, Minneapolis, MN, USA). La técnica de tinción se realizó en una teñidora “Leica Bond-Max” mientras que la visualización también se realizó es un sistema Leica basado en polímero. Tras la incubación la inmunodetección se realizó con el sistema DAKO EnVision Visualization Method (Dako, Glostrup, Carpinteria, CA) con el cromógeno di-amino-benzidina como sustrato y utilizando como contraste hematoxilina. El estudio se hizo sobre granulocitos de médula ósea, excepto la proteína MMP14 que se realizó sobre megacariocitos. La inmunodetección fue valorada por dos diferentes anatomo-patólogos utilizando el criterio de % de granulocitos y/o megacariocitos positivos en cada muestra.

## **Parte VI: Análisis funcional**

Se realizaron tres tipos de análisis funcionales. 1) Cultivos de línea celular HEL, eritroleucemia *JAK2 V617F* positiva tomada como modelo de PV. 2) Cultivo de colonias eritroides de células mononucleadas de sangre periférica de pacientes. 3) cultivo de colonias eritroides de células CD34+ de médula ósea de pacientes.

Tanto de la sangre periférica como de la médula ósea, ambos recogidos en tubos con heparina, fueron extraídas las células mononucleadas mediante técnica de Ficoll-Paque (Pharmacia, Mannheim, Alemania). A partir de las células mononucleadas de médula, se separaron las células madre hematopoyéticas (CD34+) mediante tecnología de micro bolas magnéticas (Miltenyi Bistec, Bergisch, Gladbach, Alemania). Una vez extraídas, fueron guardadas en suero/DMSO 10% y congeladas en nitrógeno líquido para su conservación hasta su utilización.

### **1. Cultivos de línea celular HEL**

Las células pertenecientes a la línea celular HEL fueron obtenidas de la colección europea DSMZ (DSMZ, Braunschweig, Alemania). Fueron cultivadas en RPMI-1640 con L-Glutamina y  $\text{NaHCO}_3$ , suplementado con 10% de suero bovino fetal e incubado en una atmósfera con 5%  $\text{CO}_2$ . Se sembró  $1 \times 10^6$  células en un flask de  $25\text{cm}^2$  en 10 ml de medio. Se realizó un cambio de medio a las 24 horas y se realizaron pases cada 3-4 días (confluencia del medio de cultivo).

Para el ensayo de inhibición, se tomó el cultivo en sub-confluencia y se sembraron 500.000 células por pocillo en placas p6 con 2 ml de medio. Se realizó cada estudio por duplicado, lo que incluía un control sin tratamiento, estudio con inhibidor de metalo-proteasas, *Marimastat* (25  $\mu\text{M}$ ) (TOCRIS Cookson Inc, Ellisville, MO), estudio con anticuerpo *C7923* (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) bloqueador de CD44 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) e inhibidor de

HSP70, *KNK437* (50  $\mu$ M) (Calbiochem, Darmstadt, Alemania). Se incubó durante 24h y se extrajeron y lavaron las células con PBS. Se analizaron los resultados mediante test de viabilidad. Se extrajeron las proteínas mediante el reactivo Cytobuster (Novagen, EMD Biosciences Inc., Madison, WI) y la adición de inhibidores de fosfatasa y proteasas. El extracto proteico fue utilizado para realizar Western Blot de las proteínas p-JAK2, p-ERK y p-P38, junto con un control de carga (Actina).

## **2. Cultivos de colonias eritroides**

### **2.1 Cultivos de colonias eritroides de células mononucleadas de sangre periférica**

Las células mononucleadas procedentes de sangre periférica fueron cultivadas y se procedió a realizar la técnica de Iscove. De forma abreviada  $5 \times 10^5$  células mononucleadas se añaden a 500  $\mu$ l de medio de cultivo que contiene metilcelulosa, eritropoyetina 3 unidades/ml, IL-3 20 ng/ml y SCF 50 ng/ml, y son sembradas en placas p24. Los cultivos se incubaron a 37°C en una estufa con humedad al 100% y una concentración del CO<sub>2</sub>, del 5%. Se consideró BFU-E a la agrupación de varias colonias (3 a 7) constituidas cada una de ellas por una agrupación celular de mas de 50 células. Las colonias eritroides se identifican por presentar una tonalidad rojiza a veces muy intensa debido a la hemoglobina que contienen los eritroblastos.

Se realizaron 3 estudios de inhibición de los cultivos de colonias eritroides, el primero con un inhibidor de MMP14, *Marimastat* (TOCRIS Cookson Inc, Ellisville, MO) a las concentraciones de (10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M y 50  $\mu$ M); el segundo con anticuerpo bloqueador anti-CD44 (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) a unas concentraciones de 10  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml y 0.1  $\mu$ g/ml, y el tercero con el inhibidor de HSP70 *KNK437* (Calbiochem, Darmstadt, Alemania) a unas concentraciones de 100  $\mu$ M, 50  $\mu$ M y 10  $\mu$ M. Cada estudio fue realizado por duplicado, además de incluirse un control sin tratamiento alguno.

Los resultados se analizaron a los 14 días tras la siembra de las células mononucleadas por diferentes métodos descritos a continuación.

## **2.2. Cultivos de colonias eritroides de progenitores hematopoiéticos de médula ósea**

Se reprodujo el ensayo de inhibición en cultivos de colonias eritroides de células mononucleadas con células madre hematopoyéticas utilizando la misma técnica Iscove, con la salvedad de que en vez de  $5 \times 10^5$  células mononucleadas, se sembraron  $2 \times 10^3$  células CD34+ por pocillo.

## **2.3. Contaje de colonias eritroides**

Se observó y realizó el contaje del número de colonias eritroides existentes en cada pocillo y su duplicado mediante microscopía óptica.

## **2.4. Test de viabilidad**

Se realizó un test de viabilidad por la técnica de tinción vital Trypan Blue. A una alícuota de 10  $\mu$ l de células de colonias extraídas y resuspendidas en 500  $\mu$ l de PBS se añadieron 10  $\mu$ l de Trypan Blue (dilución  $\frac{1}{2}$ ) y se procedió a su contaje con ayuda de una cámara de Neubauer por microscopía óptica. Se contaron las células no teñidas como células viables.

## **2.5. Citometría de flujo**

**2.5.1. Análisis de proteína CD44, CD45 y CD71:** Se utilizó en las células extraídas y lavadas con PBS de los cultivos tratados con anti-CD44 (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) 10  $\mu$ l de anticuerpo anti-CD44-PE de ratón (BD Biosciences Europe, Oxford, UK). Así mismo se utilizó un marcaje con 10  $\mu$ l de CD71-FITC (BD Biosciences Europe, Oxford, UK) para identificar la población eritroide y 10  $\mu$ l de CD45-PerCP por tubo (BD Biosciences Europe, Oxford, UK) para identificar la población pan-leucocitaria.

Se utilizó como control de isotipo 10  $\mu$ l anti-IgG1-PE-PerCP de ratón, (BD Biosciences Europe, Oxford, UK) y 10  $\mu$ l por ensayo de anti-IgG2a-FITC de ratón (BD Biosciences Europe, Oxford, UK).

**2.5.2. Análisis de proteína CD41a y CD34:** Se utilizó 10 µl del anticuerpo anti-CD41a-FITC de ratón (BD Biosciences Europe, Oxford, UK), junto con un marcaje con 5 µl de CD34-APC por tubo (BD Biosciences Europe, Oxford, UK) para diferenciar la población megacariocítica. Así mismo se diferenciará la población progenitora hematopoyética.

Se utilizó un control de isotipo con 5 µl anti-IgG2b  $\kappa$ -APC de ratón, (BD Biosciences Europe, Oxford, UK) y 10 µl anti-IgG2a-FITC de ratón por muestra. (BD Biosciences Europe, Oxford, UK).

**2.5.3. Análisis de apoptosis:** Se utilizaron 5 µl del reactivo Anexina V-APC por muestra (BD Biosciences Europe, Oxford, UK) para el ensayo de apoptosis junto con 250 µl de binding buffer 1X siguiendo las directrices del fabricante.

Se adquirieron 10.000 células totales y se utilizó la fórmula “Media geométrica muestra”/”Media geométrica control isotipo” para analizar los resultados, así como el % de células positivas para cada marcador, sustrayendo el % de células positivas del control de isotipo. Se analizaron todos estos datos por estadístico de Mann-Whitney y por comparación de medias, siendo significativo con un p-valor < 0.05.

## **2.6. Cytometric Bead Array (CBAs)**

Las CBAs son una novedosa tecnología de microesferas fluorescentes con distintas intensidades para detectar y cuantificar proteínas solubles de una determina muestra. Cada microesfera proporciona una superficie de captura para una proteína específica análoga a la superficie de un pocillo de una placa de ELISA. El principio de la técnica parte de las diferentes poblaciones de microesferas. Cada población posee una intensidad de fluorescencia característica y esta recubierta con un anticuerpo de captura específico para una determinada proteína. Para discriminar las diferentes microesferas entre si, estas emiten de forma distinta en dos fluorescencias que serán diferentes según el equipo con el que se trabaje. En función de la intensidad de florescencia cada población poseerá una posición alfa-numérica indicando su posición relativa con respecto al resto de poblaciones, llamando

al conjunto de poblaciones con diferentes posiciones analizadas a la vez “plexos”. Para conocer la cantidad de proteína que tiene una muestra se utiliza un anticuerpo de detección conjugado a PE, y con ello se podrá cuantificar la cantidad de proteína a través de la cantidad de fluorescencia emitida.

En el caso que nos ocupa, se realizó un plexo con las siguientes proteínas a estudio: fosfo-STAT1, fosfo-MEK, fosfo-P38, fosfo-AKT, y las correspondientes proteínas no fosforiladas, STAT1, MEK, P38 y AKT. Con ello se deseaba observar el efecto de los tratamientos en las más importantes vías de señalización relacionadas con JAK2, JAK-STAT, MAPK y AKT. El valor de cada proteína fosforilada se normalizó tanto frente a la concentración de su proteína no fosforilada, como de la proteína total.

## **Parte V: Análisis bioinformático y estadístico de los datos**

Muchas de las técnicas utilizadas en los presentes estudios exigen una rigurosa minería de datos, sobre todo en el caso de las técnicas de screening.

En este apartado se detallaran las herramientas y análisis bioinformáticos desglosados por técnica.

-*Microarray* de expresión: Los datos fueron normalizados a través del programa Feature Extraction (v.9.0). Cada punto temporal fue adicionalmente normalizado a tiempo cero. Los genes de los cuales se obtenían más del 10% de missing values fueron descartados, y los datos fueron normalizados mediante transformación logarítmica en base 2. Una vez normalizados, los datos fueron pre-procesados mediante la utilización de la herramienta informática, Pre-processor, dentro del software GEPAS 3.1 (<http://gepas3.bioinfo.cipf.es/>) con la finalidad de purificar los datos.

Se empleo un t-test para el análisis de patrón de expresión diferencial entre las diversas poblaciones, mediante los programas T-REX (perteneciente a GEPAS) y Pomelo II

(<http://pomelo2.bioinfo.cnio.es/>). El análisis se basó en gran medida en el programa Gen Set Enrichment Analysis (GSEA), combinando un análisis de expresión diferencial (t-test) con la interpretación funcional generando “clusters” de genes con sentido biológico (Pathways). Se asumió significación cuando, en el análisis por medio del programa GSEA, el gen pertenecía a una vía estadísticamente significativa ( $p\text{-valor} < 0.05$  y/o False discovery rate  $< 0.25$ ) y dicho gen había contribuido significativamente a las diferencias entre poblaciones de la vía a la que pertenecía (Core Enrichment: YES)<sup>54,55</sup>.

Mediante estas herramientas se realizaron los diversos análisis dicotómicos posibles entre las cinco poblaciones clasificadas de manera supervisada.

-RT-PCR, *Macroarrays* y *Microarray de microRNAs*: La cuantificación relativa se sustrajo por el método comparativo del cycle threshold (Ct)<sup>12</sup> utilizando la fórmula  $2^{-\Delta Ct}$ . Los datos extraídos de esta manera fueron normalizados mediante la transformación del logaritmo natural, y fueron analizados mediante análisis no paramétrico de Wilcoxon mediante el programa SPSS15 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA.). La significación estadística fue asumida cuando el p-valor era menor a 0.05.

Los datos también fueron analizados con el programa “Tnasas” (<http://tnasas.bioinfo.cnio.es/>) utilizado para construir modelos de predicción. Consiste en la combinación de un análisis de muestras independientes (paramétrico o no paramétrico, como puede ser un análisis de Wilcoxon) y un algoritmo de clasificación (como puede ser un análisis KNN). Construye con los datos y dichos criterios diferentes modelos con diferentes números de variables (en el caso de *microarrays*, números de genes) respecto a las dos variables que se quieren dicotomizar (en este caso, las diferentes poblaciones de pacientes) y realiza una validación cruzada para calcular el error estimado de dichos modelos.



-*Microarray* de metilación: Se depuraron y analizaron los datos, realizando los diversos análisis dicotómicos supervisados de interés. Se asumía la metilación diferencial de un gen entre dos poblaciones cuando cumplían dos condiciones:

1. El valor DeltaBeta (correspondiente a la resta del valor numérico asociado a la metilación de una de las poblaciones respecto a la otra ) era mayor a 0.3.
2. El Differential Score, es decir, análisis no paramétrico de Mann-Whitney corregido mediante False Discovery Rate (FDR), era superior a 20.0.

-Gel 2D-DIGE y MS: Para la selección de los “spots” diferencialmente expresados se aplicó el software Batch Processor del DeCyder v7.0 con las siguientes condiciones: en el caso de PV vs TE Positiva un aumento o disminución de 1.5 veces y un t-test  $< 0.05$ , además de observarse el “spot” en todas las imágenes extraídas. Se aplican dichos criterios a dos análisis de PV y TE Positiva, el primero entre ambos geles con muestras PV y TE Positiva, y el segundo, utilizando todos los geles.

Este mismo proceso se realiza para el análisis de TE Positiva vs controles, y PV vs controles, con la diferencia de que los criterios de selección fueron mas estrictos: un aumento o disminución de 3 veces y un t-test  $< 0.01$ .

Tras el análisis Gel 2D/DIGE se realizó la tinción de los geles con Sypro y se recortaron los “spots” a estudio. Fueron analizados por espectrometría de masas MALDI TOF TOF.

Los resultados fueron analizados con el software Mascot v2.1 (Matrix Science, London, UK), GPS Explorer v4.9, buscando en la base de datos de proteínas no redundantes UniProt/SwissProt (Taxonomía: Homo Sapiens).

-Western Blot: Los datos escaneados fueron analizados a través del programa ImageJ 1.41 (National Institute of Health, USA), mediante el software específico para geles. Se cuantificó la intensidad de banda y los datos fueron analizados mediante test de Mann-Whitney con el programa SPSS15 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

- Citometría de flujo: Los datos adquiridos fueron depurados con el software Summit 4.3 (Dako, Glostrup, Carpinteria, CA) Se sustrajo la media geométrica y el % de células de las diferentes poblaciones del control de isotipo a las diversas muestras estudiadas. Se analizaron los datos de medias y % de células mediante un test de Mann-Whitney.
- Inmunohistoquímica: Se aplicó en todos los casos un análisis estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis entre las cuatro poblaciones y de Mann-Whitney entre parejas de poblaciones.
- Cultivos celulares: Se realizó un análisis no paramétrico de Mann-Whitney para observar la existencia de diferencias estadísticas entre las diferentes condiciones a estudio.
- CBAs: Los resultados de CBAs fueron analizados mediante el software FCAP Array (FCS 2.0) (BD Biosciences Europe, Oxford, UK) mediante ajuste a la curva de calibración de concentración de proteína conocida.

## **4. Resultados**

### **Parte I: Análisis de expresión génica**

#### **1. *Microarray* de expresión**

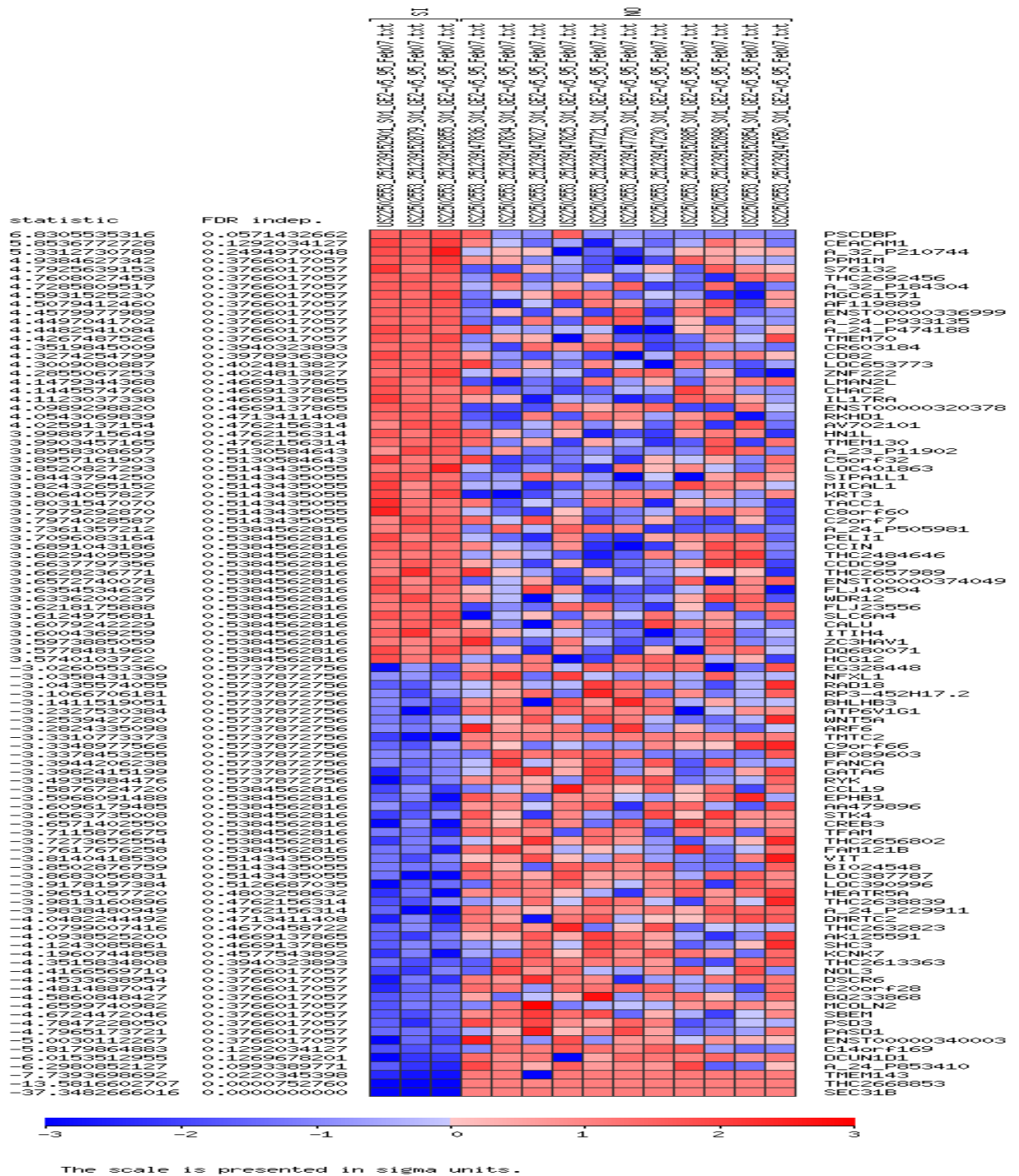
Los resultados de *microarrays* se enfocaron a través de tres análisis dicotómicos, PV vs TE positiva, TE positiva vs TE negativa y TE negativa vs TS (trombocitosis secundaria). Se obtuvieron resultados a través de los programas T-Rex, Pomelo II y GSEA, pero fueron los de este último programa los utilizados en última instancia para obtener los genes candidatos (Figura 14-15).

En el primero de ellos, resultaron 11 vías diferencialmente expresadas de manera significativa mediante el programa GSEA: FCER1PATHWAY (Figura 16), NFATPATHWAY, DSRNA\_UP, CHIARETTI\_T\_ALL, SPPAPATHWAY, IL6PATHWAY, TPOPATHWAY, MONOCYTEPATHWAY, NEUTROPHILPATHWAY, BADPATHWAY y HINATA\_NFKB\_UP. Estas 11 “pathways” incluyen un total de 84 genes que contribuyen significativamente a las diferencias que muestran las vías entre ambas poblaciones y que fueron utilizados para la generación del modelo 1 de *macroarray* de 96 genes.

En el caso del análisis TE positiva vs TE negativa, fueron 7 las vías diferencialmente expresadas entre las dos poblaciones: EDG1PATHWAY, EMT\_UP, PGC1APATHWAY, JECHLINGER\_EMT\_UP, KANNAN\_P53\_UP, NDKDYNAMINPATHWAY,

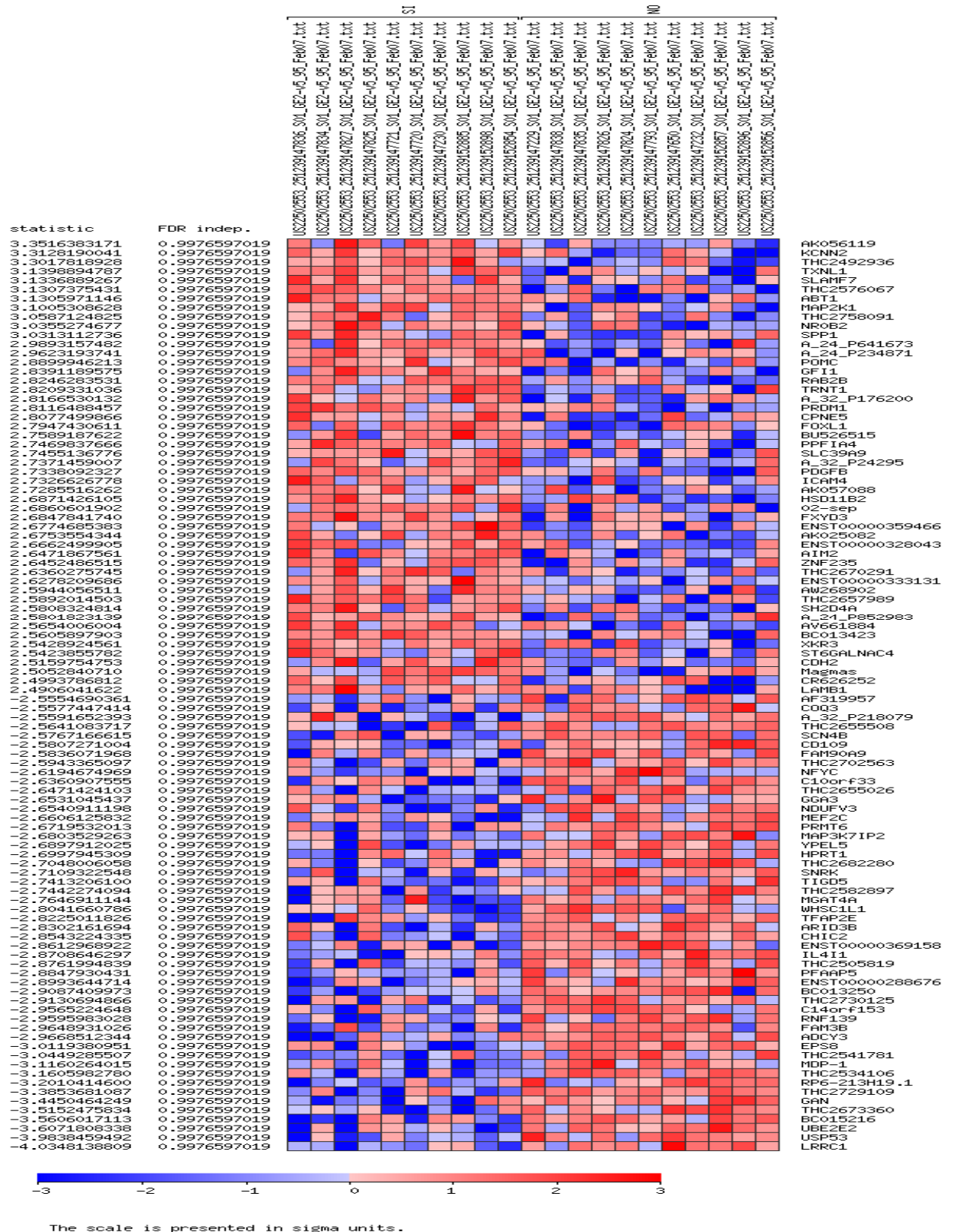
RAC1PATHWAY, de los cuales se sustrajeron 50 genes que contribuían a dichas diferencias.

Por otra parte, el estudio entre las TE negativas y las trombocitosis secundarias mostraron 8 “pathways” diferencialmente expresadas: AMIPATHWAY, CACAMPATHWAY, CROONQUIST\_IL6\_STARVE\_UP, CSKPATHWAY, FMLPPATHWAY, IL12PATHWAY, TCRAPATHWAY y TOB1PATHWAY.



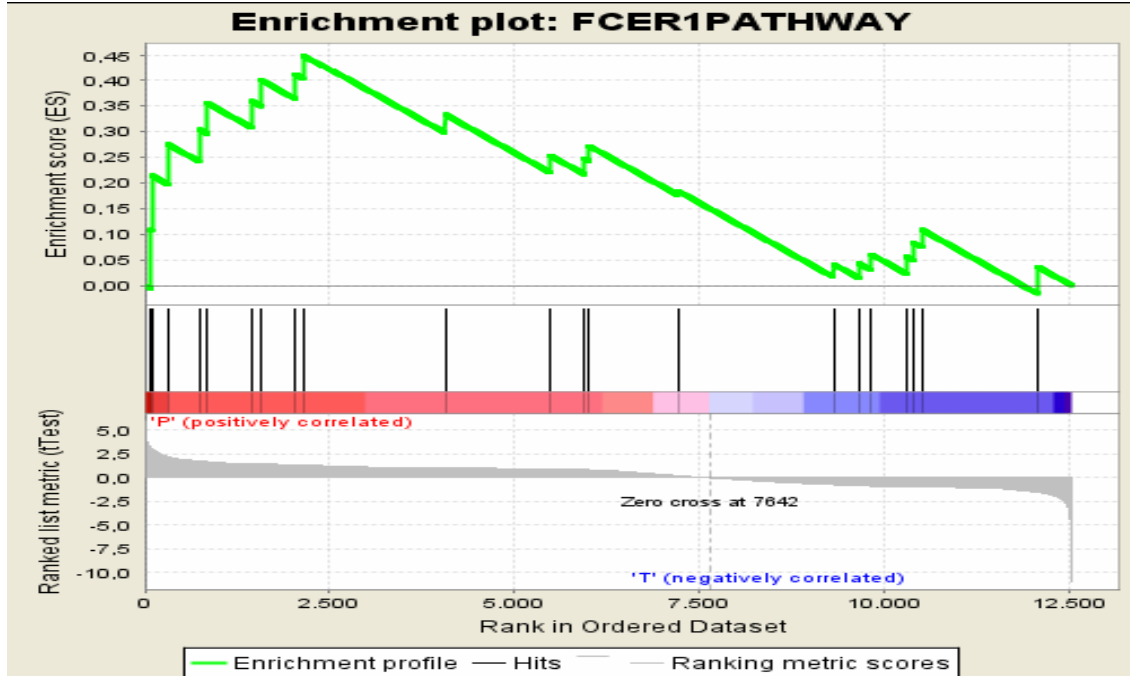
**Figura 14:** "Heat map" con los 50 genes con mayores diferencias de expresión entre las muestras de PV

(izquierda) y TE positiva (derecha) mediante t-test utilizando el programa T-REX.



**Figura 15:** Heat map con los 50 genes con mayores diferencias de expresión entre las muestras de TE positiva (izquierda) y TE negativa (derecha) mediante t-test utilizando el programa T-REX.

38 genes contribuyeron para que estas vías estuviesen más expresadas en una de las dos poblaciones respecto a la otra.



**Figura 16:** "Enrichment plot" a modo de ejemplo de una de las vías significativas, en este caso, la vía FCER1PATHWAY. Cada pico corresponde a un gen perteneciente a dicha "pathway". Las zonas distales correlacionan la contribución de la significación del gen a la significación de la vía a través de un mayor Enrichment Score (ES).

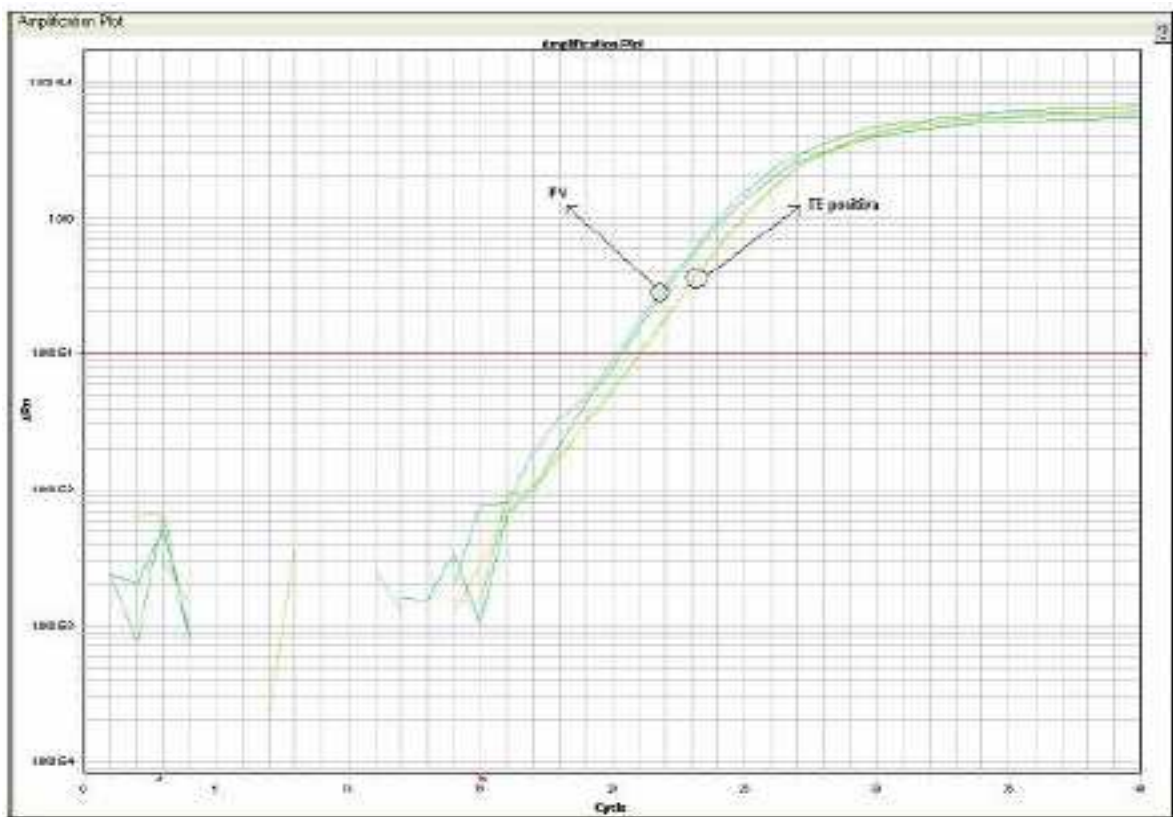
Mediante una selección por funcionalidad biológica y antecedentes en las NMPc se escogieron de los 88 genes totales pertenecientes a estos dos últimos estudios, 47 para el modelo 2 de *macroarray* de 48 genes. Se escogieron 4 genes adicionales de especial interés para realizar PCR cuantitativa en tiempo real en formato de ensayos individuales.

## 2. *Macroarray*, PCR cuantitativa en tiempo real

### 2.1 *Macroarray*, modelo 1: PV y TE positiva

Se realizó un análisis correspondiente a la búsqueda de divergencias fenotípicas entre TE positiva y PV, enfrentando ambas poblaciones.

Veinte y cuatro genes resultaron estar sobre-expresados de manera significativa en la población de PV frente a la de TE positiva (Tabla 2). Sin embargo, tan sólo 1 gen, *MMP14*, estaba diferencialmente expresado en poblaciones PV vs TE positiva, tanto en muestras de pacientes tratadas, como al diagnóstico (R: ratio = -4.442 vs -2.794;  $P = 0.000$ ), como en el conjunto de ambas. Los 24 genes restantes también se encuentran diferencialmente expresados entre PV y TE positiva en su conjunto y en la serie tratada con HU, pero no así en la serie no tratada.



**Figura 17:** Gráfico de amplificación del gen *LYN* en pacientes de PV y TE positiva

Sin embargo, muchos de estos genes son de gran interés ya que están implicados en numerosas vías proliferativas como AKT (*PIK3CA*), la familia de las kinasas Src (*SKAP2*, *LYN*) (Figura 17), la vía JAK-STAT (*JAK2*), o la vía MAPK (*MAPK14*) (Figura 18).

Así mismo, genes relacionados con *MMP14* también están expresados diferencialmente de esta manera (*CD44*). Se amplió la población con 13 TE positivas, 12 PV y 6 TE negativas



para la RT-PCR tanto de *MMP14* como de *CD44*, verificándose las diferencias encontradas previamente.

## 2.2 Macroarray, modelo 2: TE positiva, TE negativa, TS

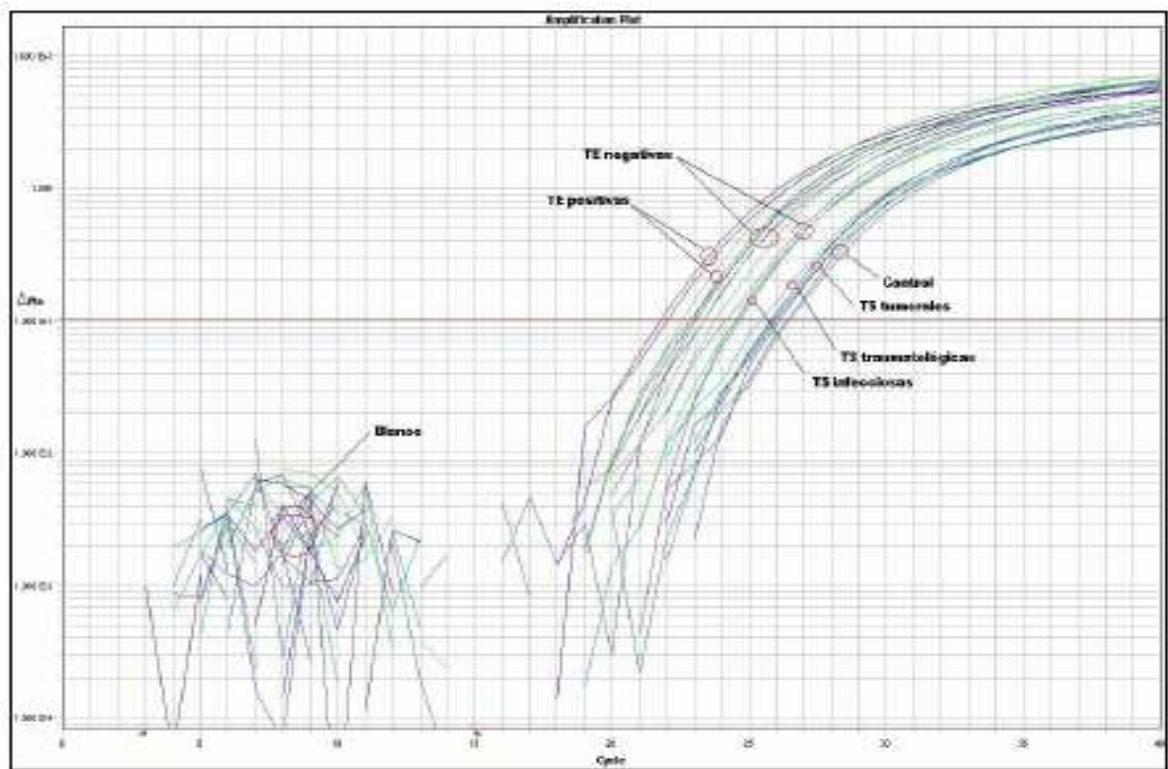
Se fijaron dos objetivos con este estudio, el primero, la búsqueda de las diferencias fisiopatogénicas entre la TE positiva y la TE negativa, confrontando ambas poblaciones, y por otro lado, la búsqueda de un gen/es que ayudasen al diagnóstico de la TE, mas concretamente, de la TE negativa, para lo cual se compararon el grupo TE negativa vs TS.

<i>Genes</i>	<i>PV vs TE</i>		
	<i>(P-valor)</i>	<i>(ratio)</i>	
		<i>TE</i>	<i>PV</i>
<i>Nº pacientes</i>	<i>20/20.</i>	<i>20</i>	<i>20</i>
<i>ACSL</i>	<b>0.044*</b>	4.072	4.609
<i>ANXA1</i>	<b>0.040*</b>	2.282	2.756
<i>BTK</i>	<b>0.0032*</b>	0.467	1.636
<i>CASP8</i>	<b>0.003*</b>	2.838	3.459
<i>CD44</i>	<b>0.008*</b>	2.422	3.229
<i>F2R</i>	<b>0.02*</b>	-2.409	-2.308
<i>FCER1G</i>	<b>0.0021*</b>	3.511	4.682
<i>FRMD4B</i>	<b>0.001*</b>	1.148	2.579
<i>GAPDH</i>	<b>0.011*</b>	2.464	3.167
<i>HMGB2</i>	<b>0.014*</b>	3.188	3.732
<i>IKZF1</i>	<b>0.022*</b>	1.102	2.187
<i>JAK2</i>	<b>0.002*</b>	1.527	2.862
<i>LITAF</i>	<b>0.002*</b>	4.366	5.142
<i>LRMP</i>	<b>0.007*</b>	2.496	3.532
<i>LYN</i>	<b>0.002*</b>	4.535	5.686
<i>MAPK14</i>	<b>0.006*</b>	3.606	4.314
<i>MMP14</i>	<b>0.000*</b>	-4.422	-2.794
<i>PECAM1</i>	<b>0.021*</b>	2.641	3.562
<i>PIK3CA</i>	<b>0.015*</b>	-0.490	0.217
<i>RAF1</i>	<b>0.005*</b>	2.039	2.954
<i>SELL</i>	<b>0.005*</b>	3.681	4.666
<i>SELP</i>	<b>0.010*</b>	-1.000	0.040
<i>SKAP2</i>	<b>0.008*</b>	2.230	3.254
<i>YWHAH</i>	<b>0.025*</b>	1.650	2.436

**Tabla 2:** Genes significativos (p-valor < 0.05) entre PV y TE positiva.

### 2.2.1 Análisis de divergencias fenotípicas

Se obtuvieron 4 genes diferencialmente expresados entre las poblaciones de TE positiva y TE negativa: *GINS1*, *NME2*, *TGFBR3* y *MAP2K1*. Se amplió la población con 13 TE positivas, 12 PV y 6 TE negativas para la RT-PCR de estos 4 genes, verificándose las diferencias encontradas previamente en los genes *MAP2K1* y *TGFBR3*, pero no así en *GINS1* y *NME2*.

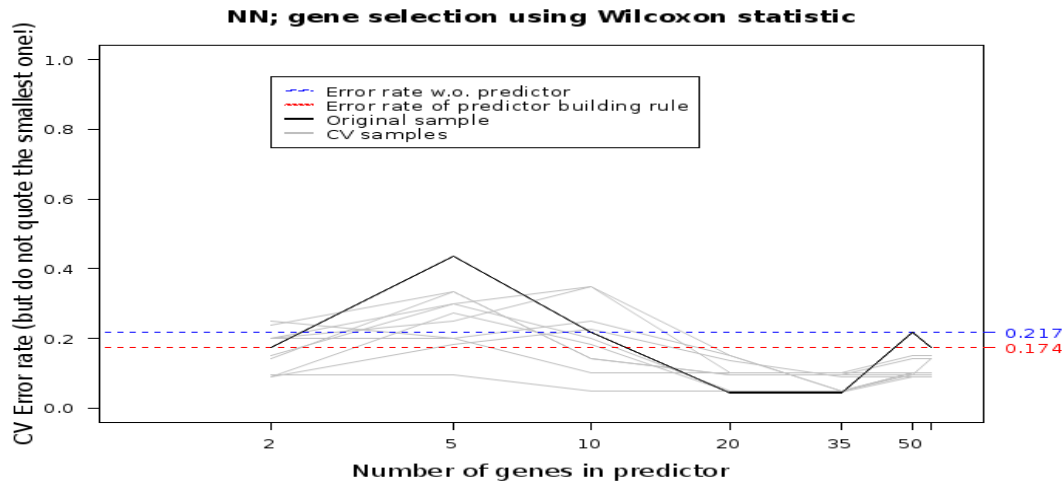


**Figura 18:** Gráfico de amplificación del gen *MAP2K1* en pacientes de TE positiva, TE negativa, TS y Controles.

### 2.2.2 Análisis de genes diagnóstico

Tan sólo un gen resultó significativo entre los grupos de TE negativa y TS: *HIF1A*.

Sin embargo, al construir un modelo de predicción utilizando el programa “Tnasas” de TE negativas frente a TS, los modelos con mínimas tasas de error eran de mas de 20 genes, excesivamente numerosos como para poderlos implementar dentro del algoritmo diagnóstico de la patología (Figura 19).



**Figura 19:** Dinámica de variación de la tasa de error (eje Y) respecto a los diferentes modelos de predicción según su número de genes (eje x) utilizando el programa TNASAS.

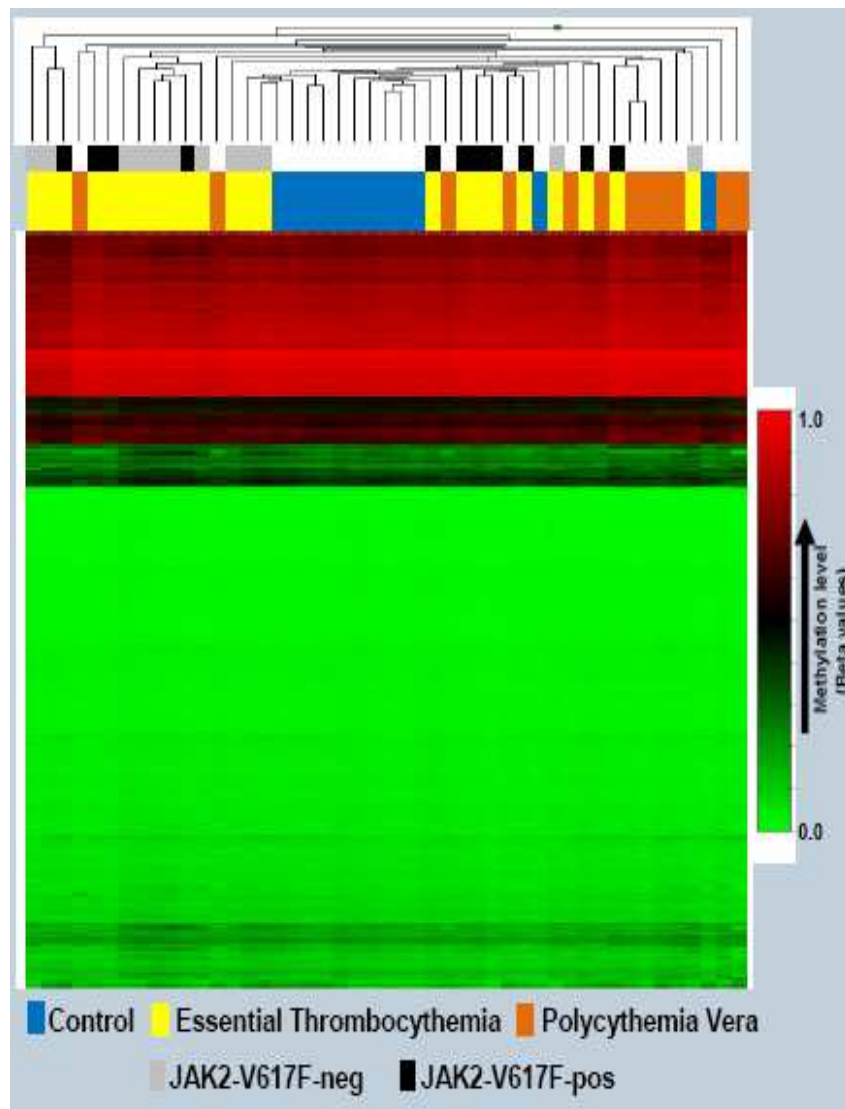
### Parte III: Análisis de metilación

Se cruzaron en análisis dicotómicos las 4 poblaciones a estudio, PV, TE positiva, TE negativa y controles. Tan sólo generaron diferencias significativas los análisis entre las poblaciones de PV y TE positiva y PV frente la población control. Las cuatro poblaciones mostraron un patrón de metilación muy homogéneo (Figura 20). Así mismo se observó el patrón de metilación de diferentes genes *SOCS*, como *SOCS1* y *SOCS2*, objetivándose en algunas de ellas una hipermetilación en todos los grupos a estudio. Se aplicaron los siguientes criterios estadísticos para aceptar diferencias entre los diversos grupos:  $\text{deltabeta} > 0.3$ ,  $\text{differential score} > 20.0$ .

#### **1. PV vs TE positiva**

Entre las poblaciones PV y TE positiva, el gen *VCY* posee una metilación diferencial de manera significativa, estando hiper-metilado en la población de PV. Sin embargo dicho resultado se descartó al tratarse el gen *VCY* de un gen del cromosoma Y, involucrado en el

desarrollo sexual del individuo, y por tanto, independiente de las patologías a estudio y motivándose las diferencias con el sexo de los pacientes.



**Figura 20:** Heat Map del *microarray* de metilación completo utilizando el Genome Studio.

## 2. PV vs Controles

El gen *ZNF577* posee una metilación diferencial entre las poblaciones de PV y control, estando metilado en la población de PV.

Se realizaron análisis estadísticos adicionales a este gen: se aplicó un test no paramétrico de Mann-Whitney entre la PV y las diferentes poblaciones, obteniendo significación las diferencias en el grado de metilación de *ZNF577* (PV vs TE positiva  $P= 0.01$ ; PV vs TE negativa  $P= 0.05$ ; PV vs controles  $P= 0.00$ ).

#### **Parte IV: Análisis de microRNAs**

Se realizó un análisis correspondiente a la búsqueda de divergencias fenotípicas entre TE positiva y PV, enfrentando ambas poblaciones mediante cuantificación del nivel de expresión de microRNAs. El resultado de la RT-PCR del conjunto de genes correspondientes a los miRNA mas comunes y el posterior análisis por test de Mann-Whitney fue el hallazgo de tan sólo un miRNA diferencialmente expresado, el miR-299, sobre-expresándose en la población de PV.

Sin embargo, cuando se realizó el análisis entre ambos tipos de TE, positiva y negativa, se encontraron 9 miRNAs diferencialmente expresados, let-7<sup>a</sup>, miR-26b, miR-99b, miR-153, miR-216b, miR-299, miR-338, miR-337 y miR-598. Estos resultados quedan pendientes de ser validados por una población mayor para un adecuado cribado, y posterior validación proteico/funcional de los miRNA resultantes.

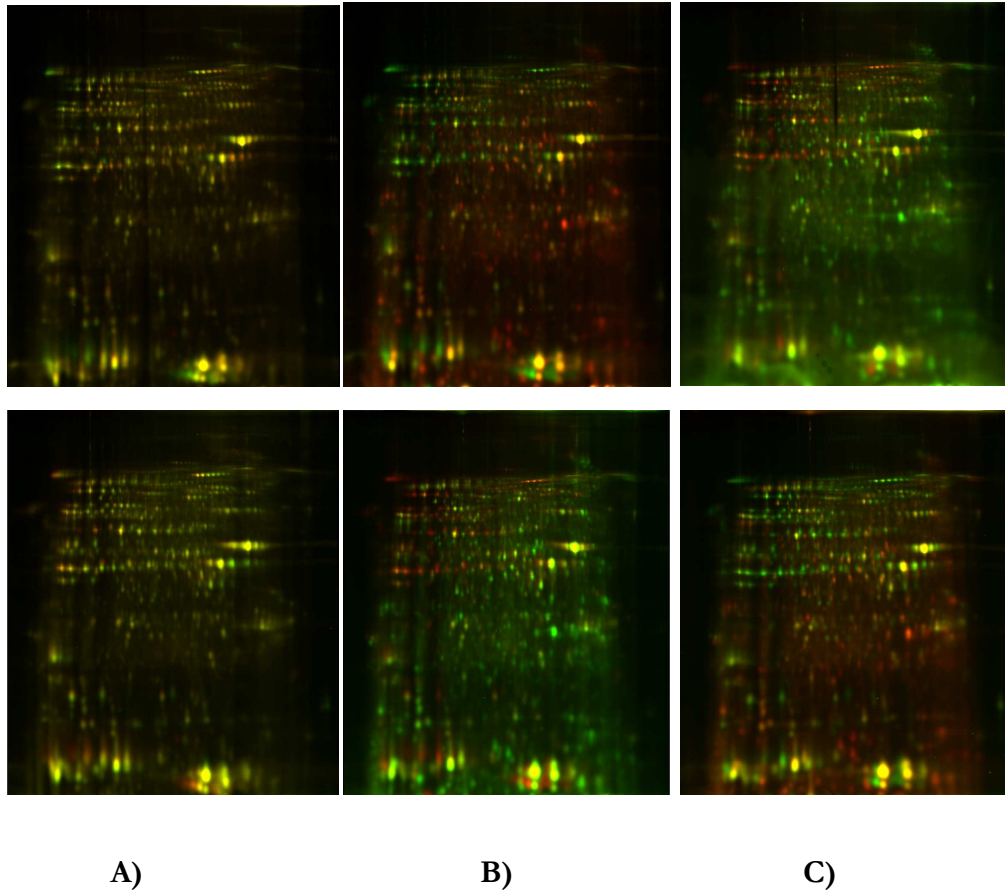
#### **Parte V: Análisis proteómicos**

##### **1. Geles 2D DIGE y espectrometría de masas**

Se analizaron individualmente los geles que contenían PV y TE positiva, PV y controles y TE positiva y controles por separado, y para los tres estudios se adicionó un análisis con todos los geles (Figura 21).

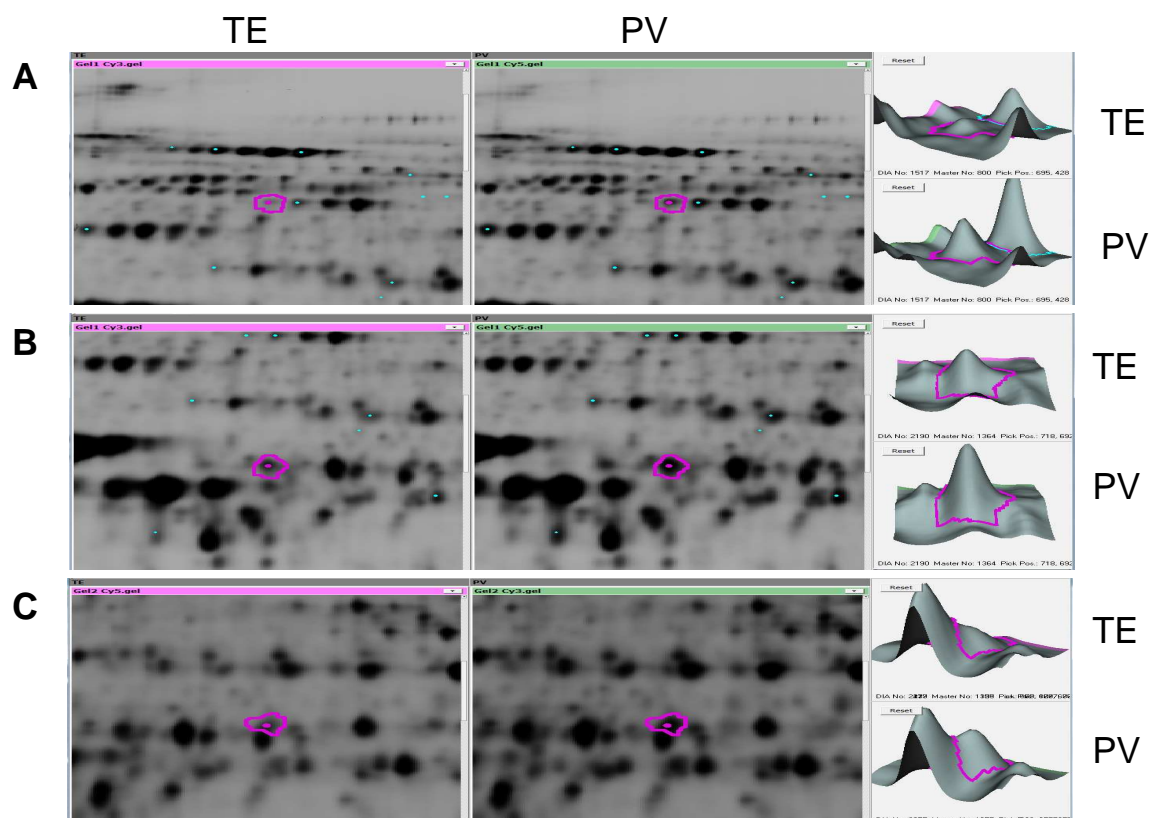
##### ***1.1 PV vs TE positiva***

Resultaron 111 proteínas diferencialmente expresadas de un total de 3419 analizadas, de las cuales se confirmaron 82 en el análisis PV vs TE positiva en todos los geles a estudio. Por otro lado, del análisis donde se manejaron sólo los 2 geles de los “pools” de PV y TE positiva, se hallaron 164 proteínas de 2614, para identificarse finalmente 112 spots.



**Figura 21:** Fotografías de los resultados de DIGE. A) PV vs TE positiva. B) TE positiva vs Control. C) PV vs Control. Cada punto (“Spot”) corresponde a una proteína. La tinción en rojo (Cy3) muestra la expresión de proteínas de la primera muestra, el verde (Cy5) el de la segunda, y el amarillo expresión conjunta de ambas muestras. Los geles están realizados por duplicado intercambiando los fluoróforos en cada tipo de muestra.

La espectrometría de masas de los spots diferencialmente expresados identificó 50 proteínas con diferente expresión entre PV y TE positiva (Tabla 3). La mayoría de las proteínas identificadas corresponden a enzimas relacionadas en procesos metabólicos y bioquímicos de la célula, sin embargo, algunas pocas proteínas estaban encuadradas en vías hematológicas, de activación leucocitaria o de diferenciación eritroide, como son los casos de la proteína HSPA1A, SERPINB1 ó LTA4H (Figura 22).



**Figura 22:** Spots en los geles 2D-DIGE correspondientes a las proteínas LTA4H (A), SERPINB1 (B) y HSPA1A (C). En todos los casos se observa una sobreexpresión de la proteína en la población de PV frente a TE.

Protein name	SwissProt	Spot nº	Nominal Mass	pI value	Mascot Score	Expect	Biological processes
Glycogen phosphorylase	PYGL	526	97486	6.71	427	4.10E-39	Metabolic
		534			432	1.30E-39	
Gelsolin	GSN	539	86043	5.9	186	5.10E-15	Cytoskeleton
		542			565	6.40E-53	
		561			667	4.10E-63	
		917			67	0.0042	
Lactotransferrin	LTF	555	80014	8.5	828	3.20E-79	Metabolic
		564			970	2.00E-93	
		626			333	1.00E-29	
		657			956	5.10E-92	
		661			670	2.00E-63	
		757			275	6.40E-24	
		1038			497	4.10E-46	
		509			141	1.60E-10	
		526			508	3.20E-47	
Moesin	MSN	671	67892	6.08	300	2.00E-26	Cytoskeleton
		678			203	1.00E-16	
		557			230	2.00E-19	
		558d			95	6.30E-06	
Transketolase	TKT	752	68519	7.58	311	1.60E-27	Metabolic
		609			671	1.60E-63	

Leukotriene A-4 hydrolase	LTA4H	800	69868	5.8	450	2.00E-41	Peptidase
		803			727	4.10E-69	Adhesion
Pyruvate kinase isoenzyme 2	PKM2	886	58470	7.96	190	2.00E-15	Metabolic
		892			113	1.00E-07	
Catalase	CAT	903	59947	6.9	742	1.30E-70	Metabolic
		907			506	5.10E-47	
Keratin, type I cytoskeletal 10	KRT10	939a	59020	5.13	150	2.00E-11	Cytoskeleton
		558c			209	2.60E-17	
Coronin-1A	CORO1A	939b	51678	6.25	140	2.00E-10	Cytoskeleton
		1160b			110	2.00E-07	
Glucose-6-phosphate	G6P	960	63335	8.43	212	1.30E-17	Metabolic
		962			248	3.20E-21	
Actin-related protein 3	ACTR3B	1104	47797	5.61	555	6.40E-52	Cytoskeleton
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	G6PD	1114	53619	6.8	198	3.20E-16	Metabolic
Alpha-enolase	ENO1	1152	47481	7.01	441	1.60E-40	Metabolic
		1160a			287	4.10E-25	
Keratin, type I cytoskeletal	KRT1	1228	62255	5.14	81	0.00016	Cytoskeleton
Phosphoglycerate kinase 1	PGK1	1288	44985	8.3	98	3.50E-06	Metabolic
		1289			93	1.10E-05	
		1134			204	8.10E-17	
Heat shock 70 kDa	HSPA1A	1339a	70294	5.48	195	6.40E-16	Anti-apoptotic
		1158			620	2.00E-58	Proliferation
		1165			471	1.60E-43	Differentiation
Actin-related protein 2	ACTR2B	1339b	45017	6.3	76	0.00056	Cytoskeleton
Fructose-bisphosphate aldolase	ALDOA	1353a	39830	6.41	82	0.00013	Metabolic
		1353b			57	0.037	
Leukocyte elastase inhibitor	SERPINB1	1364	42829	5.9	423	1.00E-38	Leukocyte adhesion
Biliverdin reductase	BLVRA	1478	33692	6.06	206	5.10E-17	Metabolic
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDHS	1494	36201	8.57	354	8.10E-32	Metabolic
		1504			364	8.10E-33	
		1515a			151	1.60E-11	
Keratin, type I cytoskeletal 9	KRT9	1515b	62255	5.14	63	0.011	Cytoskeleton
		2847			63	0.0095	
		452b			72	0.0012	
Annexin A2	ANXA2	1635	38808	7.57	974	8.10E-94	Heat-stress response
		615			959	2.60E-92	
Actin, cytoplasmic 2	ACTG1	452a	42108	5.31	91	1.70E-05	Cytoskeleton
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	KRT2	558a	65678	8.07	343	1.00E-30	Cytoskeleton
Keratin, type II cytoskeletal 1	KRT6B	558b	66170	8.15	226	5.10E-19	Cytoskeleton
Arachidonate 15-lipoxygenase	ALOX15B	591	75498	6.14	219	2.60E-18	Metabolic
Serum albumin	ALB	603	71317	5.92	74	0.00083	Transport
WD repeat-containing protein 1	TBL1Y	640	66836	6.17	550	2.00E-51	Transcription activation
		642			128	3.20E-09	
6-phosphogluconate dehydrogenase	PGD	972	53619	6.8	324	8.10E-29	Metabolic
Annexin A1	ANXA1	1325	38918	6.57	88	2.90E-05	Transport

**Tabla 3:** Proteínas identificadas por MS diferencialmente expresadas observadas por técnica de 2D-DIGE entre PV y TE.



### ***1.2 TE positiva vs Control***

Resultaron 241 proteínas de un total de 3419, de las cuales se confirmaron 171 del análisis Controles vs TE positiva en todos los geles a estudio. Por otro lado, del análisis donde se manejaron tan sólo los 2 geles donde se utilizaron los “pools” de TE positiva y Controles, se hallaron 205 proteínas de 4720, para identificarse finalmente 97 spots.

Tan sólo 6 proteínas fueron identificadas por espectrometría de masas, GSN, MSN, CORO1A PKM2, GAPDHS y RDX sin que ninguna de ellas pareciese ser relevante desde el punto de vista biológico y/o bibliográfico.

### ***1.3 PV vs Control***

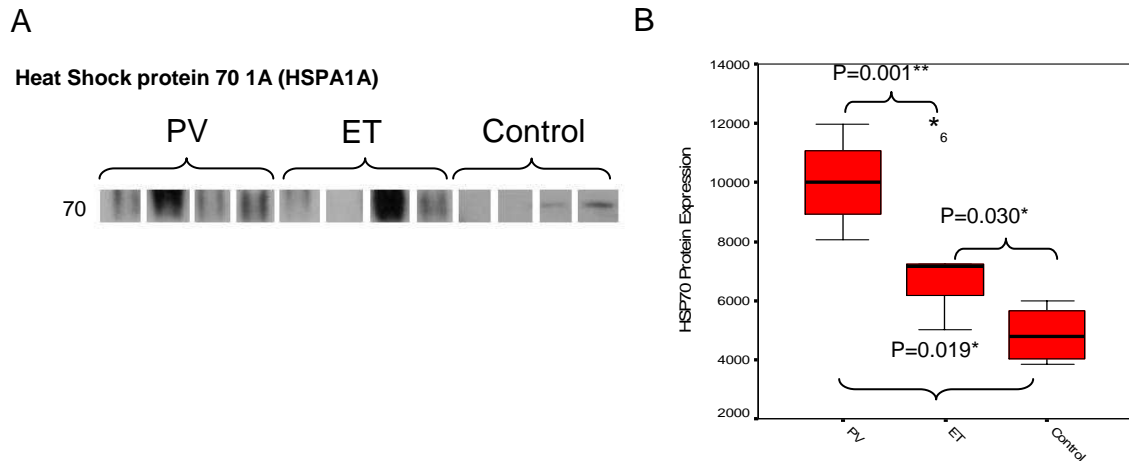
Resultaron 229 proteínas de un total de 3419, de las cuales se confirmaron 174 del análisis de los Controles vs PV positiva en todos los geles a estudio. Por otro lado, del análisis donde se manejaron tan sólo los 2 geles donde se utilizaron los “pools” de PV y Controles, se hallaron 315 proteínas de 3419, para identificarse finalmente 183 spots.

Tan sólo 34 proteínas fueron identificadas, entre las que destacaban LTA4H, coincidente en el análisis de PV frente a TE.

## **2. Western Blot**

Los resultados por Western Blot son análogos a los resultados de gel 2D-DIGE/MS para la proteína HSPA1A, encontrándose esta última sobre-expresada en la población de PV frente a la de TE ( $P=0.001$ ). Así mismo, se observó una menor expresión respecto a ambas poblaciones de los donantes sanos ( $P=0.019$  frente a PV,  $P=0.030$  frente a TE) (Figura 23). Estos resultados se observaban tanto utilizando ABL como control de carga, como valorándolo respecto a la proteína total introducida en los geles.

Sin embargo, aunque los geles 2D-DIGE/MS reflejaban una sobre-expresión de SERPINB1 y LTAH en la población de PV respecto a TE, este perfil no se observó por técnica de WB.

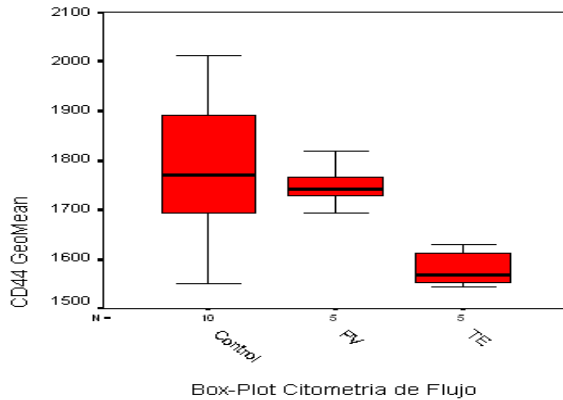


**Figura 23:** A) Western Blot de la proteína HSPA1A (HSP70). B) Box-Plot de los valores numéricos de WB cuantificados con la herramienta para geles de ImageJ.

### 3. Citometría de flujo

Se analizó la sub-población granulocítica, seleccionada a través de su tamaño y complejidad en las tres poblaciones, PV, TE positiva y Controles de la proteína CD44 tras un marcaje de las células totales de sangre periférica con un anticuerpo anti-CD44-APC, y utilizando un marcaje de las mismas células de CD45-PerCP para la comprobación de la adecuada selección de la población leucocitaria.

Analizando todas las medias de expresión en granulocitos, la población con alta expresión de CD44 posee diferencias significativas entre ambas poblaciones. Se observa una sobre-expresión en PV respecto a TE positiva de manera significativa ( $p$ -valor  $< 0.05$ ), al igual que sucedía en la expresión génica. Sin embargo, el % de células positivas es similar entre ambas poblaciones, ligeramente mayor en la población de PV pero no de manera significativa (Figura 23).



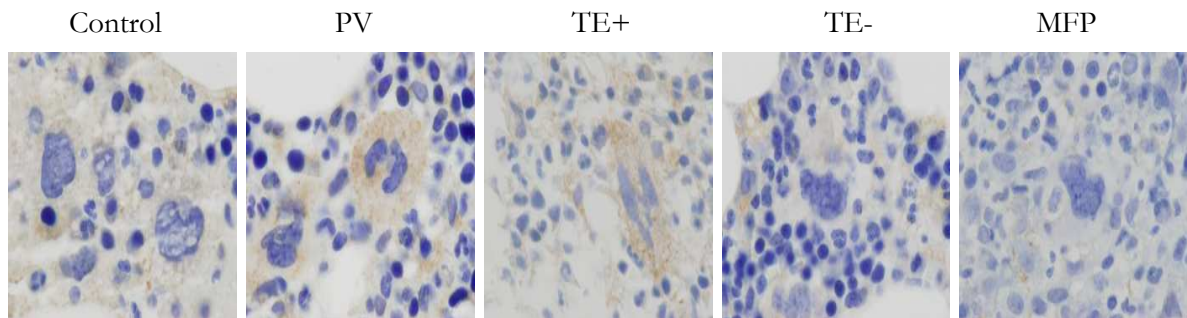
**Figura 23:** Diagrama de cajas y bigotes de la resultante media geométrica por citometría de flujo de la proteína CD44 en las siguientes poblaciones: Controles, PV y TE positiva.

#### 4. Inmunohistoquímica

Se realizó IHQ de las diversas proteínas estudiadas con anterioridad por el resto de técnicas moleculares: Gel 2D/DIGE y WB (HSPA1A, LTA4H, SERPINB1), CMF (CD44) ó RT-PCR (*MMP14*). El estudio se realizó idealmente sobre granulocitos, y secundariamente sobre megacariocitos. Se estableció muestra negativa como imperceptible expresión de la proteína, por debajo del 1% de células estudiadas. Por otro lado, es importante incidir en la dificultad del análisis en la anatomía patológica de muchas de las MFP realizadas debido al grado de fibrosis de las mismas. La fibrosis de estas provocaba en muchos casos la tinción inespecífica de las muestras lo que artefactuaba la técnica.

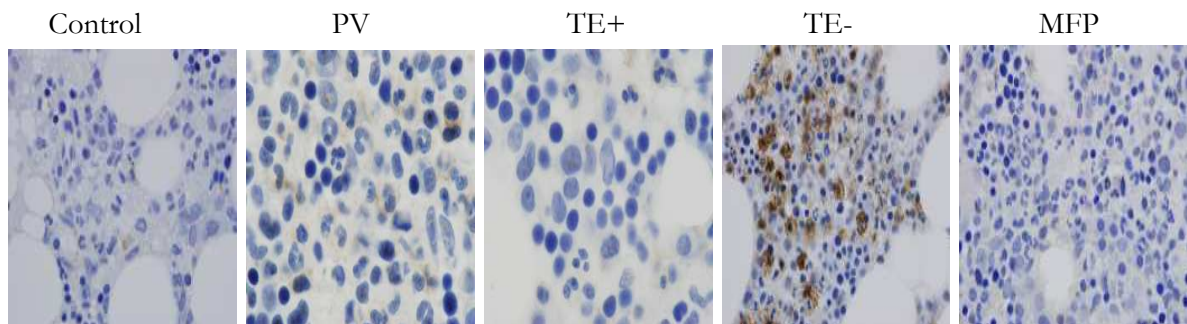
**4.1. MMP14:** La proteína MMP14 se expresaba claramente en los megacariocitos de médula ósea pero no así en los granulocitos. Los megacariocitos mostraban sobre-expresión en las muestras neoplásicas TE positiva y PV, (100% de casos positivos en ambas patologías, 73% de células positivas en TE positiva, y 60% en PV) respecto a las biopsias sanas no infiltradas (36% de casos positivos, 2% de células positivas). Sin embargo, no se observaban diferencias de expresión entre la PV y la TE positiva.

Así mismo, las muestras de TE JAK2 wild type mostraban tan sólo un 45% de casos positivos, y un 20% de células positivas (Figura 24).



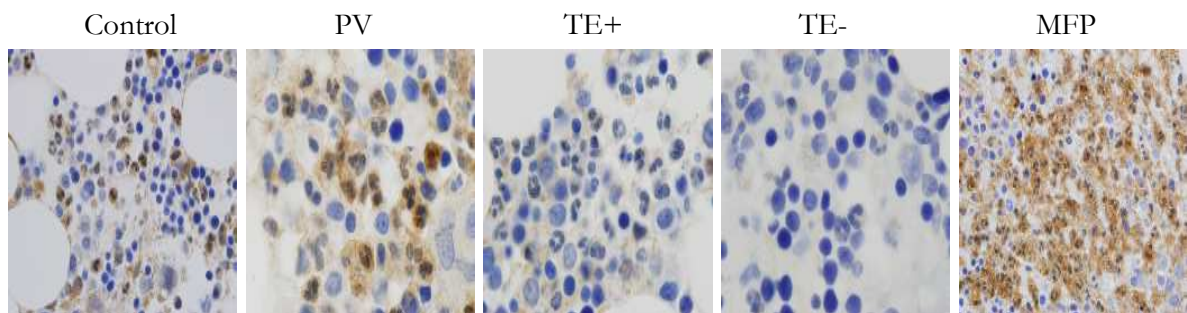
**Figura 24:** Fotografía de la IHQ correspondiente a la proteína MMP14 (marrón) en biopsias de MO.

**4.2. CD44:** Se observaba expresión de esta proteína en la membrana de los granulocitos de las biopsias de médula. Al comparar las biopsias pertenecientes a pacientes de PV (100% de casos positivos, 3% de granulocitos positivos) con los de TE positiva (100% de casos positivos, 1% de granulocitos positivos) (Figura 25) se observaba una infra-expresión de esta última de manera significativa, y esta infra-expresión en las TE positivas se mantenía al realizar la comparación frente a las médulas óseas sanas (100% de casos positivos, 2% de granulocitos positivos). Sin embargo, a pesar de estas diferencias, nos encontramos en rangos de expresión muy pequeños y difícilmente valorables, próximos a la negatividad. Por otro lado, las biopsias de pacientes de TE negativa mostraban una fuerte sobre-expresión de CD44 sobre los granulocitos (100% de casos positivos, 80% de granulocitos positivos) respecto a las restantes poblaciones a estudio (Figura 25).



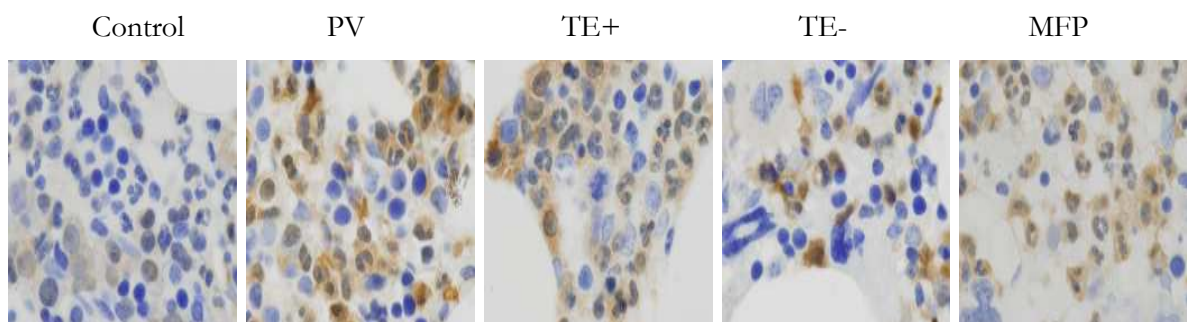
**Figura 25:** Fotografía de la IHQ correspondiente a la proteína CD44 (marrón) en biopsias de médula ósea.

**4.3. HSPA1A:** La proteína HSPA1A marcaba claramente los granulocitos de médula ósea de los pacientes con PV (72% de casos positivos, 80% de granulocitos positivos), sin embargo lo hacía de manera mucho menor o carecían de dicha tinción los granulocitos de las médulas pertenecientes a pacientes con TE (58% de casos positivos, 39% de granulocitos positivos.) (Figura 26).



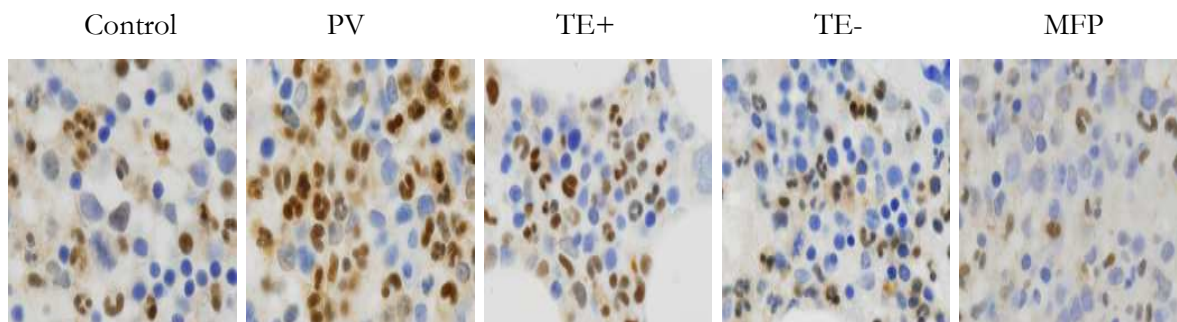
**Figura 26:** Fotografía de la IHQ correspondiente a la proteína HSPA1A (marrón) en biopsias de MO.

**4.4. SERPINB1:** Esta proteína se encontraba en el núcleo y el citoplasma de los granulocitos de las médulas óseas estudiadas. Se encontraron diferencias de expresión ( $P < 0.05$ ) entre las médulas sanas (100% casos positivos, 20% células positivas) frente a la sobre-expresión en todos los grupos patológicos de NMPc, PV (100% casos positivos, 95% de células positivas), TE JAK2 V617F (80% casos positivos, 67% de células positivas), TE JAK2 Wild Type (100% casos positivos, 95% de células positivas), y MFP (80% casos positivos, 98% de células positivas) (Figura 27).



**Figura 27:** Fotografía de la IHQ correspondiente a la proteína SERPINB1 (marrón) en biopsias de MO.

**4.5. LTA4H:** Esta proteína se observó expresada en granulocitos y muy puntualmente, en algunos megacariocitos de algunas de las muestras estudiadas. Se observó una expresión muy elevada en todas las muestras a estudio, con un 100% de los casos positivos, y valores de expresión media por patología de entre un 90% y un 98% (Figura 28).



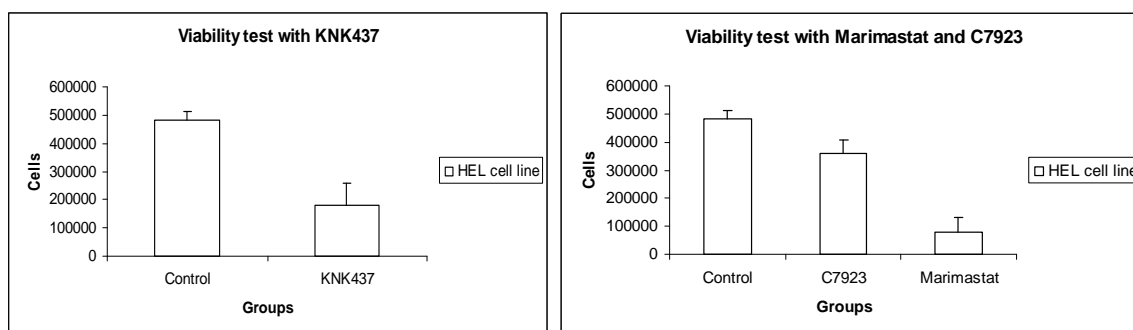
**Figura 28:** Fotografía de la IHQ correspondiente a la proteína LTA4H (marrón) en biopsias de médula ósea.

## **Parte VI: Análisis funcionales**

Se realizaron diferentes ensayos de inhibición de las moléculas a estudio, CD44, MMP14 y HSP70, a través de inhibidores relativamente específicos. En el caso de CD44, se utilizó un anticuerpo bloqueador anti-CD44, el C7923 (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania). MMP14 fue inhibido mediante *Marimastat* (TOCRIS, Cookson Inc, Ellisville, MO), inhibidor de diferentes metalo-proteasas tales como MMP2, MMP9 y MMP14. Por último, HSP70 fue inhibido a través de *KNK437* (Calbiochem, Darmstadt, Alemania), un inhibidor específico de esta chaperona. Los ensayos de inhibición fueron realizados en tres tipos de cultivos, cultivos de línea celular HEL (Eritroleucemia *JAK2 V617F* positiva), cultivos de colonias eritroides de células mononucleadas de sangre periférica de pacientes de NMPc, y cultivos de colonias eritroides de células CD34+ de médula ósea de pacientes de NMPc.

## 1. Línea HEL

El estudio de inhibición de la metalo-proteasa MMP14, CD44 y HSP70 se realizó en un cultivo en sub-confluencia utilizando los inhibidores *KNK437* (50 $\mu$ M, inhibidor de HSP70) *Marimastat* (25  $\mu$ M, inhibidor de MMPs) y *C7923* (1 $\mu$ g/ml, anticuerpo bloqueador de CD44).



**Figura 29:** Representación grafica del test de viabilidad de los ensayos de inhibición de los cultivos de HEL.

### 1.1 Test de viabilidad

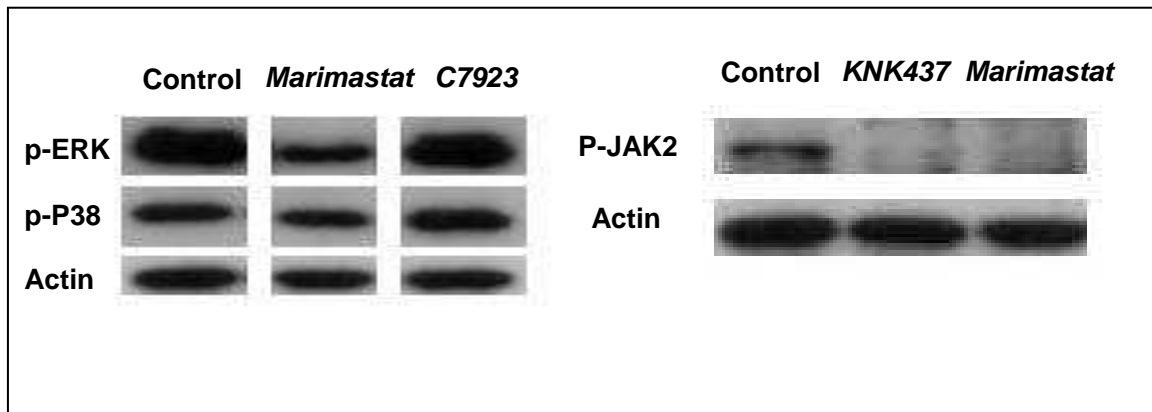
Tras 24 horas de tratamiento, se observó una disminución de la viabilidad de manera significativa con los inhibidores de MMPs y HSP70, y de forma leve con *C7923*, tal como se muestra en la figura 29.

### 1.2 WB

Así mismo, se extrajo la proteína de los cultivos tratados y no tratados, y se generó un gel SDS-PAGE y la transferencia a membrana de nitrocelulosa de las proteínas para posterior realización de WB sobre ella.

Se realizó la inmunodetección de las proteínas p-ERK, p-P38 y p-JAK2, así como actina como control de carga. El WB reveló una fuerte disminución de la activación de JAK2 mediante el inhibidor *KNK437*, así como la inhibición de la vía MAPK, a través de la disminución de las proteínas p-ERK y p-P38 en el ensayo de inhibición con *Marimastat* (Figura 30). La cuantificación de las bandas mediante el programa ImageJ confirmaron estos resultados.





**Figura 30:** WB del cultivo celular HEL de las proteínas p-ERK, p-P38, p-JAK2 y Actina con y sin tratamientos (*Marimastat* 25  $\mu$ M) (*C7923* 1  $\mu$ g/ml) (*KNK437* 50  $\mu$ M).

## 2. Cultivos de colonias eritroides en células mononucleadas de SP

Se analizó el crecimiento de colonias eritroides y el número de células en los cultivos de metilcelulosa de los tres estudios por separado. El primero, con diferentes concentraciones del inhibidor de MMP14 *Marimastat* (10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M y 50  $\mu$ M). El segundo, con el anticuerpo anti-CD44 *C7923* (10  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml y 0.1  $\mu$ g/ml). Y finalmente, con el inhibidor de HSP70 *KNK437* (10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M).

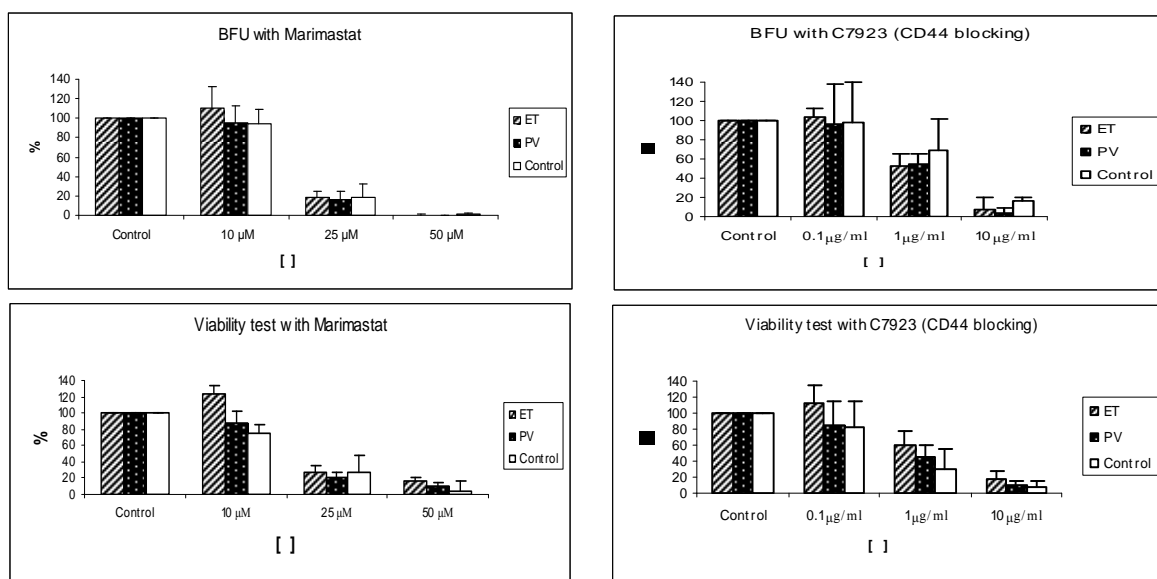
### 2.1. Contaje de colonias y test de viabilidad

En todos los casos se observó un decrecimiento tanto de número de células viables como una inhibición del crecimiento de colonias eritroides frente a los tres tratamientos a concentraciones micromolares (Figura 31 y 32).

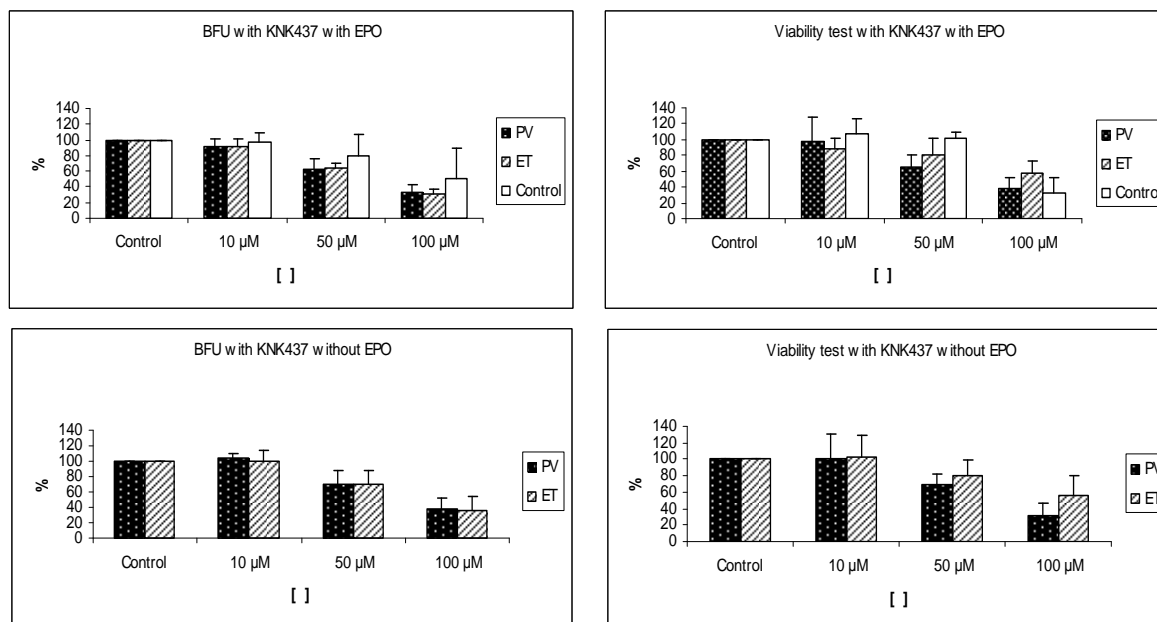
Cada ensayo fue realizado en dos tipos de cultivos diferentes, con EPO, y sin EPO (crecimiento endógeno de colonias eritroides). El comportamiento y efecto de los diferentes tratamientos fueron análogos en los cultivos con eritropoyetina y los que no tenían este componente. Cuando se compararon los resultados de muestras de PV y TE, se observaron valores muy similares de  $IC_{50}$  frente al *C7923* en ambas patologías, fenómeno similar al que sucede bajo el tratamiento con *Marimastat*. Sin embargo no así con el



inhibidor de HSP70, observándose una mayor inhibición en el caso de la PV frente a la TE y los controles (Figura 32).



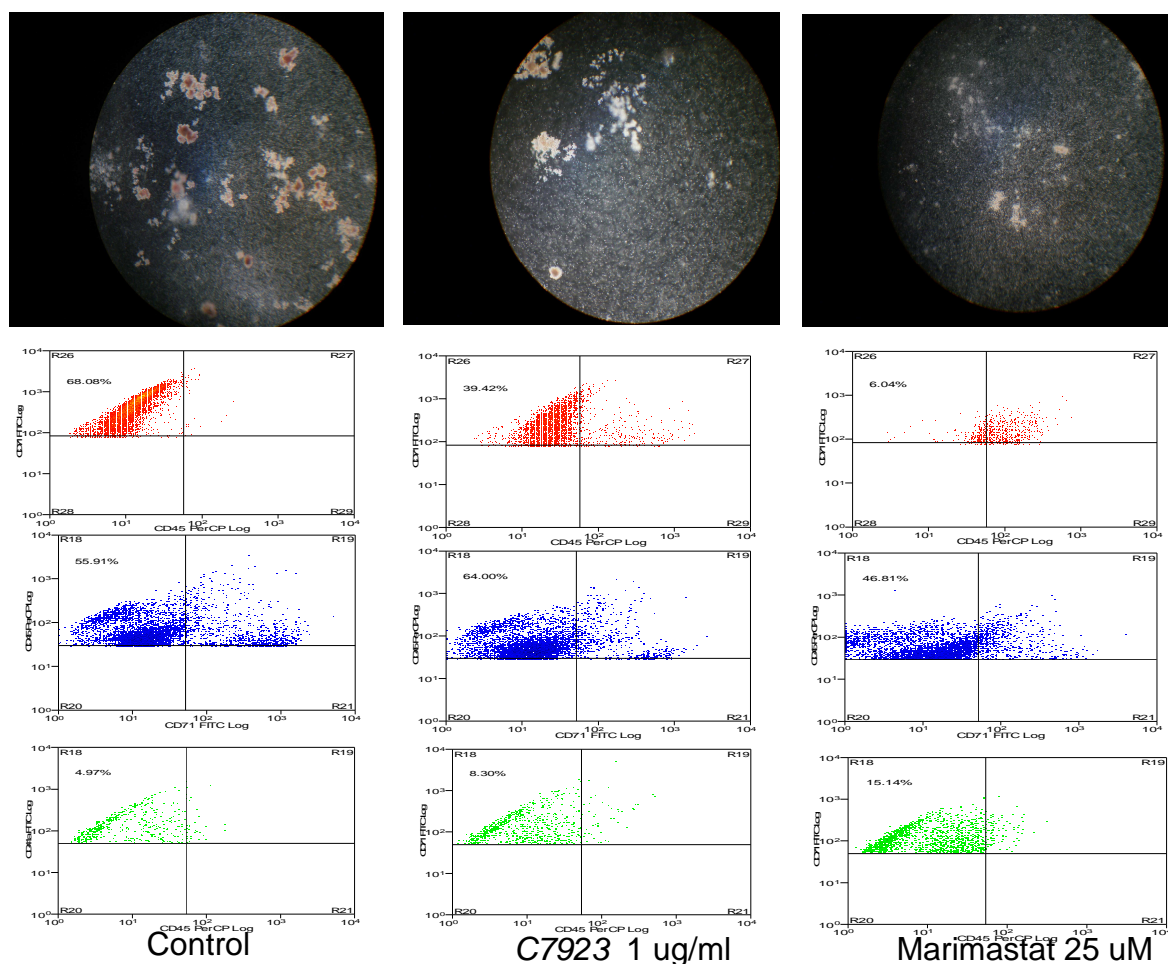
**Figura 31:** Representación grafica de conteaje de colonias y test de viabilidad de los cultivos de colonias eritroides de células mononucleadas de sangre periférica inhibidos con Marimastat (izquierda) y C7923 (derecha).



**Figura 32:** Representación grafica de conteaje de colonias y test de viabilidad con EPO (superior) y sin EPO (inferior) de los cultivos de colonias eritroides de células mononucleadas de sangre periférica inhibidos con KNK437.

## 2.2. Citometría de flujo

Los análisis de citometría de flujo de las colonias eritroides tratadas mostraban una perdida de población CD71 (marcador eritroide) y un aumento de las población CD45 (marcador pan-leucocitario) y CD41a (marcador plaquetario y megacariocítico) en los casos de la inhibición con *Marimastat* y *C7923*. Este resultado se correlacionaba con la disminución de colonias rojas pero no así de colonias blancas, observadas macroscópicamente en los cultivos (Figura 33). Por otro lado, el análisis de citometría de flujo de muestras de TE mostraban un menor número de población eritroide y una población pan-leucocitaria y megacariocítica mayor que las PV aun sin tratamiento alguno.

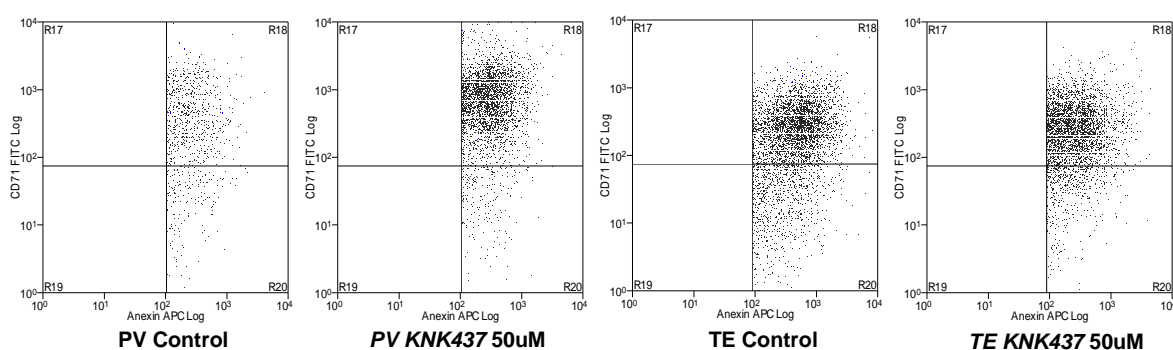


**Figura 33:** Fotografías de uno de los cultivos (PV) y Dot-Plot de la citometría de flujo de CCE sin tratamiento (izquierda), bajo tratamiento de *Anti-CD44* (centro), y de *Marimastat* (derecha). Rojo: CD71 (eritroide). Azul: CD45 (pan-leucocitario). Verde: CD41 (megacariocítica)

Tras el tratamiento con *C7923* y *Marimastat*, los resultados entre ambas patologías mostraban un perfil similar, con marcada disminución de células CD71 positivas y aumento porcentual de CD45 y CD41a. Sin embargo, no se apreciaba la disminución de ninguna de las poblaciones estudiadas tras el tratamiento con *KNK437*.

Así mismo, el marcador de muerte celular anexina no reflejaba una mayor muerte con los tratamientos ni entre las diferentes concentraciones de tratamiento de *Marimastat* y *C7923*. Este resultado contrastaba con lo que sucedía tras el tratamiento con el inhibidor de HSP70 *KNK437*. A pesar de no producir disminución en la serie eritroide, se observaba un potente incremento del marcador de apoptosis anexina, localizado en gran parte en aquellas células positivas para CD71 (Figura 34).

Este incremento de la apoptosis sólo se hacía patente en el caso de células de pacientes de PV, no observándose en los casos de TE y donantes sanos (Figura 34).



**Figura 34:** Dot-Plot de la citometría de flujo de CCE bajo tratamiento con *KNK437*. Eje y: CD71-FITC (eritroide). Eje x: Anexina-APC (apoptosis).

### 2.3. Cytometric Bead arrays (CBAs)

El análisis de las proteínas de las colonias eritroides por CBAs mostraron una disminución de la concentración normalizada con sus correspondientes proteínas nativas y proteína total de fosfo-P38 tanto en PV como en TE (Ratio PV sin tratamiento: 7.30, Ratio TE sin tratamiento: 7.16) bajo los tratamientos de *Marimastat* (Ratio PV con *Marimastat* 25  $\mu$ M: 2.9; Ratio TE con *Marimastat* 25  $\mu$ M: 4.6) y *C7923* (Ratio PV con *C7923* 1  $\mu$ g/ml: 2.19;

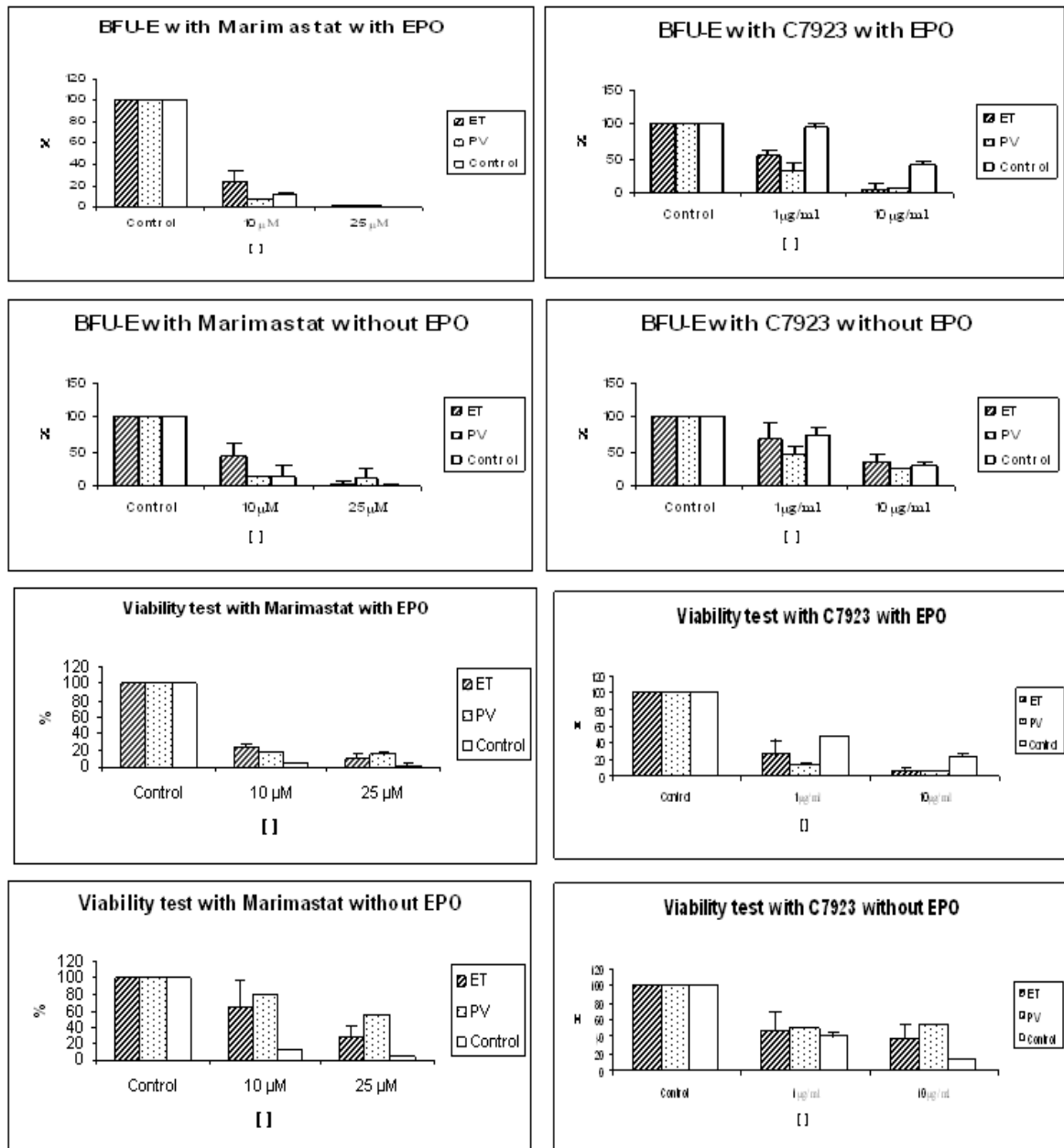
Ratio TE con *C7923* 1 µg/ml: 2.97), y en el caso de las PV bajo el tratamiento con *KNK437* (Ratio PV con *KNK437* 50 µM: 4.18). Así mismo, fosfo-MEK se encontraba disminuido en las poblaciones de TE y PV (Ratio PV sin tratamiento: 63.17; Ratio TE sin tratamiento: 66.19) bajo tratamiento con *Marimastat* (Ratio PV con *Marimastat* 25 µM: 25.4; Ratio TE con *Marimastat* 25 µM: 17.6) y *C7923* (Ratio PV con *C7923* 1 µg/ml: 13.1; Ratio TE con *C7923* 1 µg/ml: 11.7) y de PV con tratamiento de *KNK437* (Ratio PV con *KNK437* 50 µM: 25.58). Por último, fosfo-STAT1 estaba disminuido en las poblaciones de TE (Ratio TE sin tratamiento: 44.59) bajo tratamiento con *Marimastat* (Ratio TE con *Marimastat* 25 µM: 7.5) y de PV (Ratio PV sin tratamiento: 29.31) bajo tratamiento de *KNK437* (Ratio PV con *KNK437* 50 µM: 21.55). Fosfo-AKT no se encontraba en rangos de concentración suficientes para ser valorable, e igualmente no se encontraron diferencias tras los diferentes tratamientos aplicados a las células de los pacientes estudiados.

### 3. Cultivos de colonias eritroides en células CD34+ de MO

El mismo estudio de colonias eritroides realizado en células mononucleadas de sangre periférica se reprodujo con células madre hematopoyéticas (CD34+) procedentes de médula ósea de pacientes de PV y TE, y de CD34+ de donantes de cordón umbilical como controles. Se realizaron los análisis de conteo de colonias, test de viabilidad por trypan blue y CMF de igual manera. Los resultados fueron análogos a los cultivos de células mononucleadas de SP. El comportamiento y dinámica sobre los cultivos del tratamiento fue similar, pero de manera mas acusada en los cultivos de CD34+, disminuyendo los valores de IC<sub>50</sub> frente a todos los tratamientos respecto a los cultivos con células de SP.

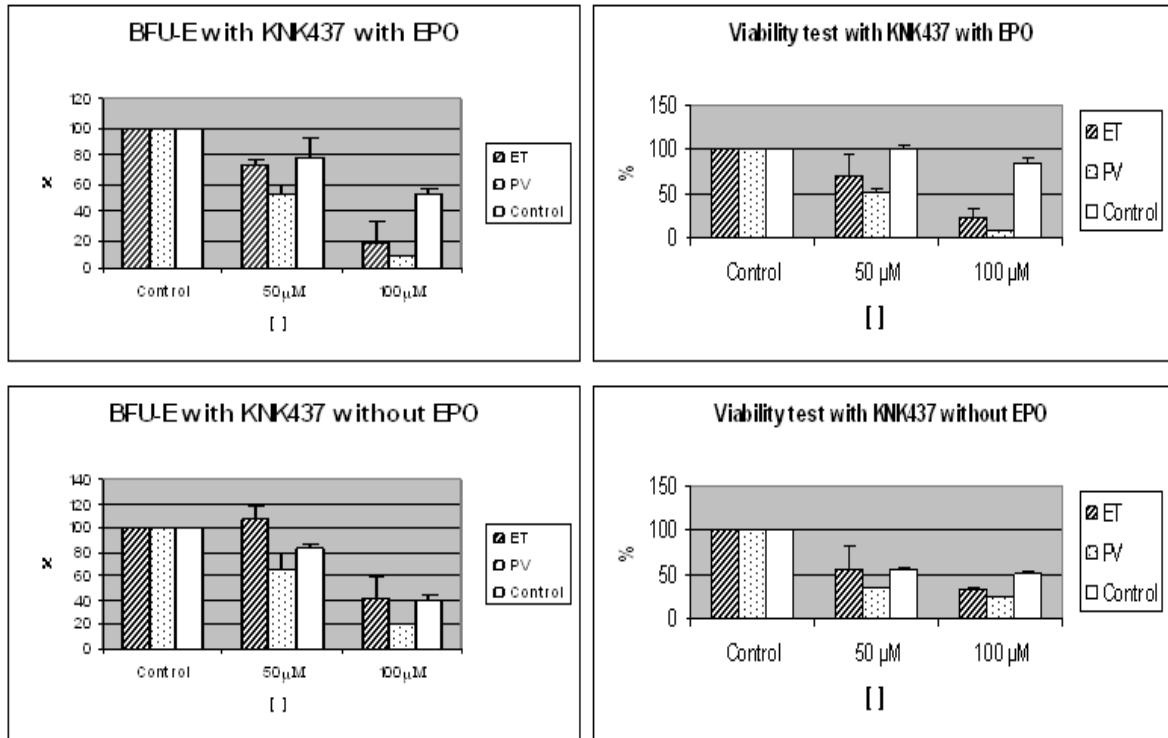
Se observó una disminución tanto del conteo de colonias como de la viabilidad celular bajo los tres tratamientos. El descenso en la viabilidad se analizó a través del valor del IC<sub>50</sub>. De esta manera, se obtuvo un valor de IC<sub>50</sub> de 5 µM en el caso del *Marimastat*, una IC<sub>50</sub> de 0.39 µg/ml en el caso del anticuerpo anti-CD44 y una IC<sub>50</sub> de 20.05 µM en el caso de *KNK437*

(Figura 35 y 36). No se encontraron diferencias significativas entre los efectos del tratamiento en los cultivos con EPO y sin EPO. Lo que respecta a las diferentes poblaciones, PV, TE y control, no parece haber una relación clara entre disminución específica de una población diferencialmente respecto a otra ni con el tratamiento de *Marimastat* ni con el tratamiento con *C7923* (Figura 35).



**Figura 35:** Representación grafica de conteaje de colonias y test de viabilidad de los cultivos de colonias eritroides de células cd34+ de médula ósea con y sin EPO inhibidos con Marimastat (izquierda) y C7923 (derecha).

Sin embargo *KNK437* produjo un efecto menor en el caso de CD34+ procedentes de cordón umbilical de donantes sanos, mas acusado en el caso de las células procedentes de TE, y aún mayor en el caso de CD34+ de PV (Figura 36).

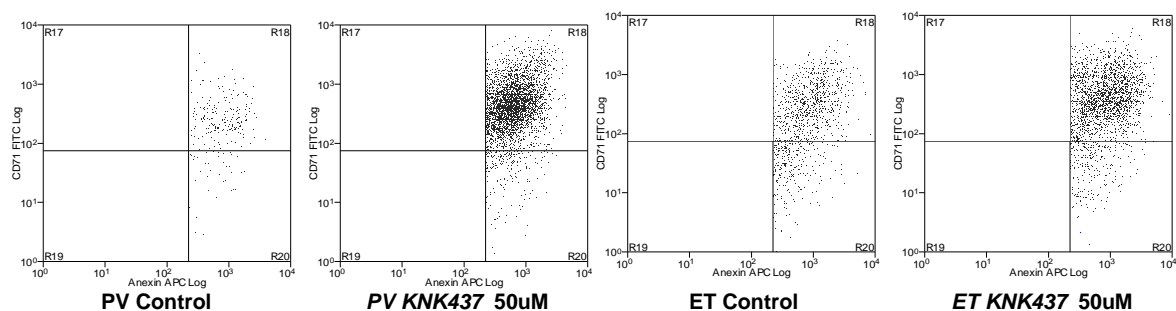


**Figura 36:** Representación grafica de conteaje de colonias y test de viabilidad de los cultivos de colonias eritroides de células cd34+ de médula ósea con y sin EPO inhibidos con *KNK437*.

Por último los resultados de citometría de flujo fueron totalmente análogos a los encontrados en los cultivos de colonias eritroides de células procedentes de SP, observándose una disminución de serie eritroide y aumento de megacariocítica y pan-leucocitaria bajo los tratamientos de *Marimastat* y *C7923*.

También se reprodujo el resultado referente al incremento de Anexina en la población CD71 positivo bajo el tratamiento de *KNK437*. Sin embargo, en el caso de cultivos de CD34+, las células procedentes de pacientes con TE si mostraban un incremento en la apoptosis de las células eritroides, fenómeno que no sucedía en los cultivos de células de SP. Sin embargo, la diferencia en la apoptosis de estas células seguía siendo considerablemente

menor en la TE (TE: 10.48% de células Anexina positivas sin tratamiento; TE: 21.27% de células Anexina positivas con *KNK437* 50 $\mu$ M) respecto a los de PV, siendo mucho mayor el % de apoptosis en estos últimos casos (PV: 9.59% de células Anexina positivas sin tratamiento; PV: 34.38% de células Anexina positivas con *KNK437* 50 $\mu$ M) (Figura 37).



**Figura 37:** Dot-Plot de la citometría de flujo de CCE de CD34+ bajo tratamiento con *KNK437*. Eje y: CD71-FITC (eritroide). Eje x: Anexina-APC (apoptosis).

## **5. Discusión**

### **Parte I: Nuevos biomarcadores en NMPc. CD44, una nueva herramienta diagnóstica.**

La expresión aberrante de una proteína o de un gen en las neoplasias puede significar su implicación biológica en la patología. Sin embargo, dicho resultado por sí sólo no es suficiente para verificarlo. Incluso si confluyese la expresión aberrante tanto génica como proteica de una molécula, tanto el papel en la fisiopatogenia de la patología como su uso como diana terapéutica debiesen ser validados a nivel funcional. Sin embargo, el hallazgo de la expresión aberrante de una proteína y/o gen, lo suficientemente diferente respecto al resto de poblaciones a estudio es el descubrimiento de una importante herramienta como biomarcador. La búsqueda de nuevos biomarcadores de las NMPc con la motivación de la mejora y facilitación del diagnóstico es parte del núcleo de esta tesis. Se mostró un especial interés en el hallazgo de algún biomarcador de TE negativa debido a la dificultad y complejidad del diagnóstico diferencial en esta patología.

Los resultados de nuestras investigaciones reflejan cuatro genes diferencialmente expresados entre la TE positiva y la TE negativa: *TGFBR3*, *MAP2K1*, *GINS1* y *NME2*. Sin embargo, tanto *GINS1* como *NME2* perdieron dicha significación al aumentar la población a estudio.

*MAP2K1* (*MEK*), es un gen central dentro de la vía MAPK. Numerosos autores han descrito la importancia de la vía MAPK en las NMPc, concretamente en la PV, e interrelacionándola con la vía JAK2 y la mutación *JAK2 V617F*<sup>5,67</sup>. Sin embargo, en el presente estudio existe una sobre-expresión de *MAP2K1* en TE negativa, no apoyando la



hipótesis de una relación *JAK2* mutado- vía JAK-vía MAPK, y sugiriendo una alternativa a la señalización JAK-STAT que promueva la proliferación en NMPc *JAK2 V617F* negativas, la vía MAPK.

*GIN51* es un gen relacionado con la cromatina y la replicación del DNA. Por tanto, la sobre-expresión del mismo puede motivar o ser consecuencia de un aumento de proliferación. Que se encuentre dicha sobre-expresión en la población de TE positiva respecto a la TE no mutada, puede sugerir algún tipo de relación con la vía JAK2, donde una mayor carga mutacional produzca dicho suceso<sup>68</sup>.

El gen *NME2* se ha implicado en la metástasis, el desarrollo y la diferenciación, y puede inhibir la proliferación, siendo mediado por la vía MAPK. También tiene su implicación en otras patologías hematológicas, como en la leucemia mieloide crónica, donde es un antígeno asociado a dicha patología<sup>69,70</sup>.

Por último, el gen *TGFBR3*, que transcribe para la proteína del receptor de TGF, está implicado en un gran número de funciones mediante interacción con la citocina TGF, como pueden ser diferenciación celular, progresión del ciclo celular, reparación y desarrollo de tejidos, migración, adhesión, etc. La pérdida de expresión o inhibición de este gen se ha asociado con procesos tumorales como la metástasis o la migración celular. Que se encuentre sobre-expresado en la TE negativa sugiere que puede poseer una ventaja en el desarrollo de la patología, análogo al efecto que pudiese ejercer la mutación de *JAK2* en la TE positiva<sup>71</sup>.

Otros estudios moleculares así como la inclusión de un mayor número de poblaciones, deben completar los resultados obtenidos hasta el momento, tanto de *TGFBR3* y *MAP2K1* como de *GIN51* y *NME2* para verificar el potencial uso como biomarcador de estas moléculas.

Por otro lado, también se encontró el gen *CD44* diferencialmente expresado entre las poblaciones de PV y TE positiva. La proteína CD44 es el receptor del ácido hialurónico, y está íntimamente ligado a MMP14, compartiendo función en la remodelación de la matriz extracelular<sup>72</sup>. El receptor del ácido hialurónico es una proteína ubicua en la mayoría de las estirpes celulares. Tiene una estrecha relación con proteínas de citoesqueleto y proteínas relacionadas con la adhesión y la remodelación de la matriz celular como las metalo-proteasas<sup>73</sup>. CD44 también fue estudiada por citometría de flujo. Se comprobó la infra-expresión de la proteína CD44 en los pacientes de TE positiva frente a los de PV. En este caso, hay una correlación entre la expresión génica y proteica en los granulocitos de SP.

También se comprobó la expresión de CD44 sobre los granulocitos de MO. Nuestros hallazgos muestran una fuerte sobre-expresión de esta proteína en los granulocitos de MO pertenecientes a pacientes de TE negativas frente a las restantes poblaciones. De esta manera, esto motiva el uso como biomarcador de CD44, y de la técnica de IHQ de esta proteína como factor diagnóstico de las TE negativas, grupo de difícil diagnóstico hasta ahora al no tener un marcador molecular en un alto porcentaje de estos pacientes.

Finalmente, SERPINB1 es mas conocido como “serpin peptidase inhibitor”, y su función es la de protector ante las endopeptidasas y regulador de numerosas proteasas: “Neutrophil proteases elastase”, Catepsina G, Proteinasa-3, Quimasa, Quimiotripsina, y Kallikreina-3. Este papel protector le implica en la supervivencia y maduración de los neutrófilos, tanto de SP como de MO, y especialmente de las series inmaduras de la línea mieloide<sup>74</sup>. También parece jugar un papel protector respecto a la migración y metástasis en algunos fenómenos neoplásicos<sup>75</sup>, aunque otros autores han encontrado justo lo contrario, una sobre-expresión de esta proteína en cánceres con un alto grado de migración y metástasis<sup>76</sup>.

Los geles 2D-DIGE son una técnica relativamente novedosa en lo que a las técnicas de “screening” se refiere, y de las pocas existentes en el campo proteómico. En el campo de la

onco-hematología se han realizado numerosas cribas moleculares a nivel génico pero son escasos los estudios de cribaje de proteomas completos.

El presente estudio es la primera investigación que estudia el proteoma completo (al menos de la fracción citosólica) de células mieloides de las NMPc, PV y TE positiva, y por tanto no ha sido encontrado ningún trabajo similar publicado con anterioridad. Mediante esta metodología se encontraron mas de 50 proteínas diferencialmente expresadas entre las poblaciones de PV y TE, grupo donde se encuentra SERPINB1, proteína sobre-expresada en la población de PV.

Con la finalidad de validar los resultados encontrados por la técnica de geles 2D-DIGE/MS, se realizó IHQ de la molécula SERPINB1. Esta molécula, bien representada en la población granulocítica, mostraba una sobre-expresión en los granulocitos de MO en todos aquellos pacientes con NMPc, independientemente de la patología en cuestión, y apenas se observó expresión en pacientes control. Como ya se ha comentado con anterioridad, tiene un importante papel en la supervivencia de esta estirpe celular protegiendo de la proteólisis, así como en la maduración de formas inmaduras mieloides. La sobre-expresión de esta molécula en neoplasias altamente metastáticas, y su expresión en granulocitos, hace pensar que puede estar relacionada con fenómenos de adhesión (o con pérdida de la misma). Es decir, por una parte la infiltración leucocitaria que se produce en numerosas MO de las NMPc puede estar motivada por la expresión de esta proteína, que a su vez, en colaboración con el aumento de granulocitos puede estar jugando un papel en la adhesión de la serie mieloide de MO que provoque supervivencia, proliferación y diferenciación de dicha serie.

Sin embargo, más que su potencial papel en la fisiopatogenia de las NMPc, lo que parece claro es su posible uso como herramienta diagnóstica, tanto en las PV, como en las TE y en las MFP.

## **Parte II: ZNF577, una anomalía en el perfil epigenético de las NMPc**

Tras observar un perfil de expresión génica diferencial entre las patologías a estudio, era importante descartar o confirmar que estas diferencias no estaban motivadas por un control epigenético como el que puede ejercer la metilación en el genoma. Existen pocos antecedentes bibliográficos de estudios de metilación en NMPc<sup>77,78</sup>.

En el caso que nos ocupa, tan sólo un gen podría justificar la importancia de la metilación en las NMPc, concretamente, en el caso de la PV, el gen *ZNF577*. Su perfil epigenético presentaba una hipermetilación en la PV diferencial respecto a los restantes grupos. Este gen transcribe para una proteína de dedos de Zinc cuya función es la regulación de la transcripción, y por tanto, la menor expresión del gen debido a su hipermetilación puede desembocar en una variación en los niveles de transcripción.

Además del gen *ZNF577*, se centró el estudio en los genes *SOCS*, los cuales pueden jugar un papel relevante en las NMPc, y la hipermetilación de algunos de ellos está descrita en estas patologías<sup>79,80</sup>. Sin embargo se comprobó que dicha hipermetilación se mantiene en los donantes sanos, lo que sugiere que es tejido-específica y no dependiente de la patología como afirmaba la literatura hasta ahora.

Estos resultados no concuerdan con los descritos en la bibliografía, ya que se están incrementando día a día los hallazgos de nuevas alteraciones del gen *TET2* o *IDH2* en las NMPc. El gen *TET2* transcribe para la enzima encargada en la conversión de 5-metilcitosina (5mC) a 5-hidroximetilcitosina (hmC). Juega un importante papel en la mielopoyesis, y aunque no del todo definido el papel de hmC, parece jugar un papel en la estructura de la cromatina y en el reclutamiento de componentes para la desmetilación de la citosina. Por tanto, la hipótesis en este respecto es que a pesar de las numerosas alteraciones encontradas en el gen *TET2* el perfil de metilación no se encuentra lo

suficientemente alterado en las NMPc como para ser testados agentes desmetilantes como la 5-Azacetidina. Sin embargo, es de reseñar que en otras patologías como las SMD o la LMA, patologías a las que pueden progresar las NMPc, la metilación si parece jugar un papel muy relevante.

A la vista de los resultados obtenidos en este campo, podemos concluir que la metilación, en el sentido amplio de la palabra, no parece jugar un papel clave, tanto en la génesis de la fisiopatogenia de estas patologías, ni en las divergencias fenotípicas existentes entre las mismas, ya que todos los grupos a estudio, PV, TE positiva, TE negativa y controles, presentaban prácticamente el mismo perfil de metilación, con excepción del gen *ZNF577*<sup>81</sup>.

### **Parte III: MMP14, las metalo-proteasas en la fisiopatogenia de las NMPc.**

Con objeto de encontrar nuevos genes candidatos que explicasen la fisiopatogenia de las NMPc y que pudiesen ser utilizados como dianas farmacológicas, se realizó un *microarray* de expresión. Los genes resultantes en nuestros análisis coinciden en algunos casos con los resultados previos de análisis de *microarrays* descritos en la bibliografía (*FCER1G*, *MAPK14*, etc.)<sup>9,56,82</sup>. Sin embargo, hay un gran número de resultados de nuestra investigación, tanto de *microarray* como verificados por PCR cuantitativa en tiempo real que son completamente novedosos.

Un único gen, *MMP14* mostró significación entre ambas patologías independientemente del tratamiento a HU, es decir, se observaron diferencias significativas en los tres análisis por separado, muestras de PV y TE positiva con tratamiento, muestras de PV y TE sin tratamiento, y muestras de PV y TE con y sin tratamiento<sup>83</sup>. El gen *MMP14* transcribe para una metalo-proteasa interrelacionada en adhesión y metástasis tumoral, e indirectamente relacionado con la vía MAPK. Así mismo, numerosos autores han conectado la vía MAPK

con la fisiopatogenia de la PV<sup>10,56</sup>. Por otro lado, se ha observado sobre-expresada la proteína MMP14 en mielofibrosis primaria (MFP), siendo modulado por TIMP2, el cual posee un potencial eritropoyético<sup>84,85</sup>. Por último, se ha descrito la implicación de algunas metalo-proteasas como MMP2 y MMP9 en la evolución de la MFP, observándose sobre-expresión de algunos subtipos celulares como células endoteliales o megacarioblastos<sup>86</sup> e implicándose en el truncamiento de la proteína CXCL12<sup>87</sup>.

Sin embargo, existen otros genes con significación estadística entre las poblaciones de PV y TE positiva. Entre estos genes, resulta especialmente atractivo el gen *CD44* del cual ya hemos hablado. Sin embargo, no se trata del único gen interesante en este grupo, también se encuentran cuatro grandes vías/familias proliferativas bien representadas: *MAPK14*, *MAP2K1*, *RAF1* (vía MAPK), *PIK3CA*, *FRMD4B* (vía AKT), *LYN*, *FCER1G*, *BTk*, *SKAP2* (Familia de las kinasas Src), y *JAK2* (vía *JAK-STAT*). Un pequeño grupo de genes de la vía MAPK está diferencialmente expresado en pacientes con NMPc, sobre-expresándose en el grupo PV, pudiéndose interrelacionar con la expresión de *JAK2*. Entre estos genes se incluye *RAF1*, *MAP2K1* o *MAPK14*, descrita su importancia en la patogénesis de la PV<sup>10,56,58,88</sup>.

*AKT* es el gen central de la vía AKT, estando involucrado en la patogénesis de las MPN (PV y TE) tanto por sobre-activación como sobre-expresión<sup>10,58,89</sup>. Nuestros resultados reflejan que el gen *PIK3CA*, un regulador de *AKT*, esta sobre-expresado en los pacientes con PV, pudiendo estar implicado en este fenómeno también debido a su posible relación con la sobre-expresión de *JAK2*, ya que está descrito un vínculo entre ambas vías, JAK-STAT y AKT<sup>90</sup>.

*BTk* es un gen miembro de la familia Src relacionado en la hematopoyesis como otros miembros de dicha familia, que contribuyen a la señalización vía receptor de la EPO<sup>24</sup>.

El presente estudio refleja que los genes *LYN*, *FCER1G* y *SKAP2* están sobre-expresados en la población de PV. La relación de esta familia con la respuesta al tratamiento es de gran

interés, ya que hace susceptible de tratamientos dirigidos a inhibir estas moléculas, como puede ser el fármaco Dasatinib, frente a las NMPc. De hecho, ya existen investigaciones con resultados esperanzadores del Dasatinib en cultivos de colonias frente a NMPc<sup>91,92</sup>.

Por último, el gen *IKZF1* (IKAROS) se encuentra igualmente sobre-expresado en los pacientes con PV. Este gen está implicado en la diferenciación eritroide en fases tempranas de la gestación y el humano adulto<sup>52,93</sup>. Un exceso de isoformas de *IKZF1* está descrito en otras patologías hematológicas tal como la leucemia aguda, y su implicación parece relevante en la evolución de las NMPc a LMA<sup>94</sup>.

La mayor expresión de este gen puede estar provocando un exceso de proliferación y diferenciación en la policitemia vera.

La médula ósea es el nicho donde se genera la patología de las NMPc. El origen de las NMPc es la expansión clonal de una célula madre hematopoyética mieloide. Las condiciones ambientales, la celularidad, la cantidad y porcentaje de subtipos celulares y el comportamiento de los mismos pueden ser y son diferentes en muchas de las estirpes celulares estudiadas. Por ello la verificación de los resultados observados en SP han de ser validados en MO para confirmar la implicación de las moléculas estudiadas en las NMPc.

Este es el caso de la proteína MMP14, estudiada por IHQ en MO. La proteína MMP14 se encontró diferencialmente expresada en los megacariocitos de las poblaciones *JAK2 V617F* positivas, entre las que se incluían las NMPc PV y TE positivas, frente a las poblaciones *JAK2 V617F* negativas donde se encuadraban TE negativas y controles. De esta manera parece existir una relación directa entre la alta expresión de MMP14 y la mayor tasa de carga mutacional. Está descrito la inducción de numerosas metalo-proteasas mediante la activación tanto de la vía MAPK como de la vía JAK-STAT<sup>95</sup>. Este resultado apoyaría la hipótesis de la inducción de otra metalo-proteasa, en nuestro caso MMP14, a través de la vía JAK-STAT. Por tanto, ante una mayor activación de la vía, como la que

sucede en los pacientes mutados, se observa una mayor expresión de MMP14. MMP14 está involucrado en procesos de remodelación de la matriz celular que conllevan pérdida de adhesión y migración, y esto a su vez, proliferación y/o diferenciación de células de la médula ósea. Vinculada a la función de MMP14, se encuentra el ya descrito receptor del ácido hialurónico, CD44. La función de la proteína CD44, la remodelación, adhesión y migración celular, y concretamente de los granulocitos, la hace una perfecta candidata para ser la causante de dos fenómenos que suceden en las NMPc. El primero sucede en la SP de los enfermos con NMPc, y es el incremento de fenómenos trombóticos y hemorrágicos que ocurren en estas patologías. Aunque cabría pensar en una relación de estos fenómenos únicamente con el exceso de hematocrito (en el caso de PV) y de plaquetas (en el caso de la TE), pero la leucocitosis ha sido descrita en la bibliografía como un elemento clave en el aumento de este tipo de eventos<sup>96-98</sup>. Por otro lado, sin descartar la posible implicación de CD44 en el resto de NMPc, parece jugar un papel relevante en la TE negativa. El otro fenómeno que podría desencadenar CD44 en las NMPc sería el desarrollo, proliferación y diferenciación de la línea mieloide en la MO de pacientes con NMPc, para el cual la adhesión juega un papel importante.

En contra de lo que sucede en las NMPc *JAK2 V617F* positivas respecto a la expresión de MMP14, la adhesión no parece jugar un papel clave en las TE negativas, ya que CD44 es una típica molécula involucrada en la adhesión. Es mas, en numerosas neoplasias se observa una infra-expresión de CD44 o al menos un mayor procesamiento de este receptor por moléculas tales como las propias MMPs, sobre todo en aquellas patologías con procesos metastáticos relacionados<sup>99</sup>. Sin embargo, CD44 tiene otras formas para contribuir a la fisiopatogenia de la patología. Para comenzar, este receptor, mediante unión a diferentes ligandos, puede ser plataforma para factores de crecimiento, así como funcionar como co-receptor que modifique la actividad de tirosín-kinasas tales como MET o ERBB<sup>99</sup>.

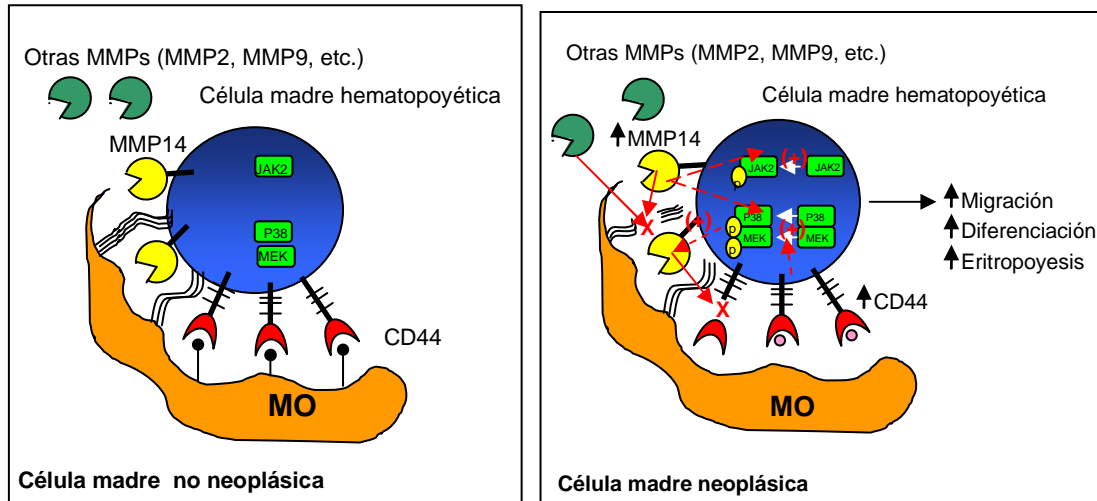


Sin embargo, los resultados descritos hasta el momento sólo describen la expresión de los granulocitos de SP, y tendremos que corroborar este exceso de expresión en granulocitos de MO para poder aseverar esta hipótesis.

El estudio funcional, es decir, la evidencia de la activación o falta de la misma de una determinada vía y/o proteína sobre un modelo de la patología es la verificación más fiable para confirmar la relación de dicha vía y/o proteína en la fisiopatogenia de una patología. La única dificultad estriba en seleccionar correctamente el modelo sobre el cual realizar el estudio, sea sobre células de pacientes, cultivos de líneas celulares, modelos murinos, etc. Para verificar los resultados obtenidos correctamente, el presente estudio ha analizado estos procesos en tres diferentes cultivos celulares: línea celular HEL, cultivos de colonias eritroides de células mononucleadas de SP, y cultivo de colonias eritroides de células CD34+ de MO. El método de análisis de las proteínas estudiadas fue la inhibición de dichas moléculas, en nuestro caso, MMP14 (mediante *Marimastat*) y CD44 (mediante anticuerpo *C7923*).

En todos los cultivos estudiados hubo un resultado común, la inhibición de la celularidad existente, ya fuese como disminución de formadores de colonias (en los cultivos de CCE), como en la disminución de la propia viabilidad celular (en todos los cultivos analizados). Así mismo, cuando se estudiaron en detalle los CCE por CMF se observó la disminución de la población eritroide en todas las muestras analizadas, pero no así de las restantes poblaciones celulares. Y es mas, cuando se analizó las cascadas de activación de las vías mas importantes conocidas en NMPc, JAK-STAT, MAPK y AKT, se observó una inactivación de la vía MAPK (p-P38 y p-MEK) frente al tratamiento con *C7923* y *Marimastat* JAK-STAT (p-JAK2) frente al inhibidor de MMP14. Por tanto, podemos ratificar el importante papel de MMP14 y CD44 en la proliferación/diferenciación/supervivencia eritroide, siendo importantes para la señalización de la vía MAPK y de la vía JAK-STAT en el caso de

MMP14. Por ello, la sobre-expresión del gen *MMP14* y de su correspondiente proteína en las NMPc *JAK2 V617F* positivas puede contribuir a la generación del fenotipo mieloproliferativo, especialmente en la PV, al producir pérdida de adhesión de células de la serie mieloide y fomentar la eritropoyesis a través de la vía MAPK y JAK/STAT.



**Figura 38:** Mecanismo propuesto de la implicación de las metalo-proteasas en la fisiopatogenia de las NMPc. Izquierda: una célula madre no neoplásica, con una correcta adhesión a la matriz. Derecha: una célula madre neoplásica. MMP14 esta sobre-expresada y actúa mediante proteólisis de proteínas de unión a MO y escisión del receptor CD44, y activación de vía JAK-STAT y MAPK. CD44, también sobre-expresado es escindido por MMP14, pero también actúa como co-receptor de otros ligandos, activando vía MAPK. Todo ello genera la pérdida de adhesión a la MO, que propicia migración, diferenciación y eritropoyesis.

También parece producirse un bucle de retro-alimentación en los pacientes *JAK2 V617F* positivos, promoviendo la vía JAK-STAT a metalo-proteasas como MMP14 y esta a su vez, confluyendo en la activación de la vía JAK-STAT. Por otro lado, los pacientes *JAK2 V617F* negativos no escapan al alcance de dicha regulación vía MAPK, promovida por la proteína CD44. Este resultado parece *a priori* contradictorio, ya que CD44 posee en cierta medida, una función antagónica con MMP14, puesto que promueve adhesión, y por tanto, falta de migración, proliferación, etc. Sin embargo CD44 es una proteína que cuenta con múltiples funciones. Una de ellas, es la de ser plataforma de actuación de numerosas

metalo-proteasas, y por ello un exceso de expresión de CD44 no es incompatible con los mecanismos moleculares de MMP14<sup>100</sup>. Por otro lado, CD44 también es capaz por si misma mediante uniones a ligando específicos de actuar como co-receptor de la regulación de cascadas de señalización, como hemos comprobado en este caso con la vía MAPK a través de moléculas como p-MEK ó p-P38.

De esta manera, tanto CD44 como MMP14 se revelan como potenciales dianas terapéuticas de NMPC y han de ser estudiadas en profundidad.

#### **Parte IV: La implicación de la chaperona HSP70 en la fisiopatogenia de PV**

HSP70 es una proteína perteneciente a la familia de las “Heat Shock Proteins” (HSP), cuya función principal es la regulación del correcto plegamiento de un gran número de proteínas, sin cuya actuación, muchas de ellas serian mal-funcionales, y que son activadas mediante diferentes señales de estrés<sup>101</sup>. Sin embargo, otra de sus funciones clave de esta HSP específica es la evasión de la apoptosis de un gran número de estirpes celulares<sup>102,103</sup>. A nivel hematológico, se ha descrito una protección de la proteólisis de GATA1 por parte de HSP70. GATA1 es un factor de transcripción clave en la hematopoyesis y diferenciación celular hematológica, especialmente de la serie eritroide<sup>104-108</sup>. Así mismo, HSP70 se ha descrito como un mediador en la señalización de la EPO en la serie eritroide. Las chaperonas tienen un papel recurrente en numerosos procesos neoplásicos. Concretamente, HSP70 ha mostrado sobre-expresión en los SMD<sup>109</sup>, LMC ó LLA<sup>110</sup>. De igual manera, nuestros resultados muestran sobre-expresión en la patología de PV.

La primera evidencia de sobre-expresión de esta proteína en PV fue encontrada mediante la técnica de geles 2D-DIGE. Cincuenta proteínas se encontraron diferencialmente expresadas entre las poblaciones de PV y TE, pero tan solo tres de ellas fueron

seleccionadas para su estudio por su especial interés biológico y fisiopatogénico: HSPA1A, SERPINB1 y LTA4H.

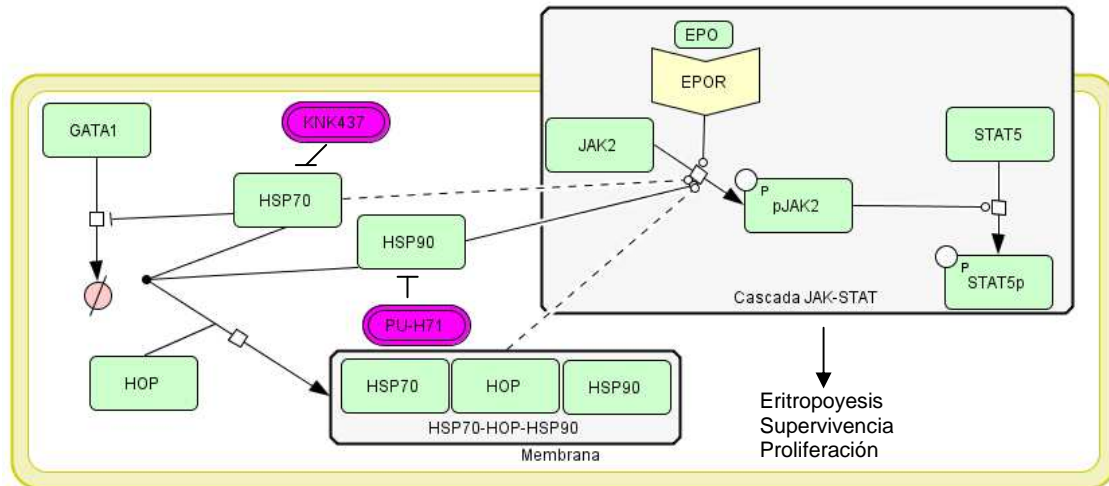
La proteína HSPA1A (HSP70) juega un importante papel en la regulación de la apoptosis, bloqueándola a diferentes niveles mediante la inhibición de señales inductoras de estrés. HSP70 interviene críticamente en la inhibición de la apoptosis promovida por la caspasa-3, cuya diana final es GATA-1, proteína de vital importancia en la diferenciación eritroide<sup>111,112</sup>, lo que le hace una gran candidata para desarrollar su estudio a nivel molecular.

Los resultados de IHQ sobre la proteína HSP70 verificaron los hallazgos encontrados por la técnica de geles 2D-DIGE/MS y WB, la sobre-expresión de la proteína HSP70 en granulocitos de la PV respecto a la TE. Esto abrió la posibilidad de describir el papel de HSP70 mas que en la fisiopatogenia de las NMPc, en la divergencia fenotípica entre PV y TE. Si se obvia la hipótesis del *continuum*, que describe la tasa de carga mutacional *JAK2 V617F* como la pieza fundamental que produce el salto de una patología en otra, es evidente que otros elementos, moléculas y/o alteraciones han de estar presentes, o en este caso, ausentes, en una patología respecto a la otra. Este es el caso de HSP70, proteína involucrada en la supervivencia celular y de la diferenciación eritroide, la cual puede ser clave en la patología de la PV, pero no así en el de la TE.

Mediante el análisis funcional en los 3 modelos *ex-vivo*, observamos el efecto inhibitor en la viabilidad celular y en la formación de colonias eritroides con un inhibidor específico de HSP70, *KNK437*. Este efecto no era el mismo en todas las poblaciones estudiadas, sino que era significativamente superior en la PV frente a la TE y controles. Un estudio de los subtipos celulares de los cultivos tratados por CMF no mostraba aumento o disminución de una estirpe u otra, sin embargo, si se observaba un importante incremento en los niveles

de apoptosis de las células de serie eritroide. Este aumento también era específico de la PV, incremento inferior o inexistente en los grupos de TE y control. El estudio que se realizó para observar el efecto de dicho inhibidor sobre las cascadas de señalización mostró una inhibición de la vía MAPK y JAK-STAT, concretamente a través de la molécula p-JAK2 y p-P38. Por tanto, podemos asumir que HSP70 es una proteína estrechamente relacionada con la supervivencia y proliferación eritroide, fenómeno íntimamente ligado a la señalización de la vía JAK-STAT. Esta relación es consistente con la bibliografía, encontrándose la implicación de HSP70 y las vías JAK-STAT/MAPK en procesos biológicos asociados a estrés como en el estrés oxidativo<sup>113</sup>. Así mismo, hemos verificado esta función y la importancia de la misma en el fenotipo de PV.

Esto da lugar a la hipótesis de HSP70 como potencial diana terapéutica de la PV. De manera análoga, recientemente ha sido descrito un inhibidor de HSP90, PU-H71, como potencial tratamiento de las NMPc, concretamente de la PV y la TE<sup>114</sup>. HSP90 es una proteína también perteneciente a la familia de las “Heat Shock Proteins”, pero su relación con HSP70 no se limita únicamente a su familia. También están descritas funciones comunes para ambas proteínas, y es más, la capacidad de formar complejos HSP70-HSP90 para una mayor eficacia en algunas de ellas. El complejo HSP70-HSP90 normalmente necesita una proteína que las interrelacione. Comúnmente esta proteína es conocida como HOP, formando el complejo HSP70-HOP-HSP90<sup>115</sup>. Marubayashi detalla en su artículo la eficacia del tratamiento de PU-H71 en modelos *ex-vivos* e *in-vivos* al inhibir HSP90, debido a que la propia HSP90 es capaz de unirse a JAK2 y a p-JAK2, y promueve su activación.



**Figura 39:** Mecanismo de acción de activación de la cascada JAK-STAT mediada por las chaperonas HSP70 y HSP90. La inhibición de ambas chaperonas, mediada por *KNK437* en el caso de HSP70, o por *PU-H71* en el caso de HSP90, promueve la defosforilación de JAK2 y la inactivación de la cascada JAK-STAT. Se postula que el complejo HSP70-HOP-HSP90 puede ejercer un efecto similar al que realizan ambas HSP por separado.

Además se ha descrito que el tratamiento de PU-H71 es capaz de tener una respuesta molecular, es decir, es capaz de disminuir la carga mutacional de *JAK2*, fenómeno que no siempre son capaces de producir los nuevos inhibidores de JAK2. Siguiendo esta argumentación, podemos hipotetizar que HSP70 actual de igual manera, activando a JAK2 (mediante unión directa o a través de otra molécula) y cuya inhibición, como sucede en HSP90, desemboca en la inactivación de JAK2, y por ende, de la cascada de señalización JAK-STAT, lo que genera en el caso de HSP70, un aumento de la muerte celular programada de la serie eritroide. Por otro lado, no ha de descartarse la posibilidad de que ambas chaperonas, HSP90 y HSP70 funcionen de manera combinada como complejo produciendo los efectos ya descritos. La formación de este complejo no sólo podría actuar a través de JAK2 directamente, sino que se ha descrito la activación de algunas metaloproteasas como MMP2 en fenómenos neoplásicos por dicha unión de proteínas<sup>116</sup>.

En definitiva, HSP70 no sólo parece jugar un importante papel en la divergencia fenotípica y la fisiopatogenia de la PV al proteger y desarrollar la serie eritroide, sino que los inhibidores dirigidos contra esta molécula pueden ser una buena alternativa a los nuevos inhibidores de JAK2, sobre todo en lo que respecta a pacientes resistentes o que deban abandonar el tratamiento por toxicidad ya que poseen la misma diana que estos pero a un nivel diferente.

## **6. Conclusiones**

1. Los estudios de cribado, como los geles 2D-DIGE son una estrategia adecuada para encontrar nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas.
2. HSP70 parece jugar un papel clave en la fisiopatogenia y la divergencia fenotípica de la PV, produciendo una activación de la cascada JAK-STAT y con ello promoviendo proliferación, diferenciación y mayor supervivencia eritroide.
3. HSP70 puede ser utilizada como eficaz diana farmacológica y *KNK437* como posible tratamiento de la PV.
4. CD44 se ha revelado como un eficaz biomarcador de TE negativa, y la técnica de IHQ de granulocitos de biopsias de MO de esta proteína como una potencial herramienta diagnóstica para dicha patología.
5. MMP14 y CD44 son claves en la proliferación/diferenciación/supervivencia eritroide mediante la activación de la vía MAPK, pudiendo jugar un papel en las NMPc, y siendo potenciales dianas farmacológicas de estas patologías.
6. SERPINB1 ha mostrado diferencias suficientemente importantes para ser estudiado como futuro biomarcador de las NMPc. La IHQ de dicha proteína sobre granulocitos de biopsias de MO puede ser utilizado en un futuro como herramienta diagnóstica.
7. Tan sólo un gen, *ZNF577*, posee diferencias en el perfil de metilación en las NMPc, hipermetilado en la patología de PV. Sin embargo, la falta de diferencias en el perfil de metilación no sugiere la aplicación de tratamientos con desmetilantes para la cura de las NMPc.



## **7. Bibliografía**

1. Dameshek W. Editorial: Some Speculations on the Myeloproliferative Syndromes. *Blood*. 1951;6:372-375.
2. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood*. 2007;8:8.
3. Goldman JM, Green AR, Holyoake T, et al. Chronic myeloproliferative diseases with and without the Ph chromosome: some unresolved issues. *Leukemia*. 2009.
4. Vannucchi AM, Guglielmelli P. Molecular pathophysiology of Philadelphia-negative myeloproliferative disorders: beyond JAK2 and MPL mutations. *Haematologica*. 2008;93:972-976.
5. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005;365:1054-1061.
6. James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434:1144-1148.
7. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352:1779-1790.
8. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7:387-397.
9. Kralovics R, Teo SS, Buser AS, et al. Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlates with activation of signaling by the V617F mutation of Jak2. *Blood*. 2005;106:3374-3376.
10. James C. The JAK2V617F mutation in polycythemia vera and other myeloproliferative disorders: one mutation for three diseases? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008:69-75.
11. Rapado I, Albizua E, Ayala R, et al. Validity test study of JAK2 V617F and allele burden quantification in the diagnosis of myeloproliferative diseases. *Ann Hematol*. 2008;87:741-749.
12. Rapado I, Grande S, Albizua E, et al. High resolution melting analysis for JAK2 Exon 14 and Exon 12 mutations: a diagnostic tool for myeloproliferative neoplasms. *J Mol Diagn*. 2009;11:155-161.

13. Barosi G, Besses C, Birgegard G, et al. A unified definition of clinical resistance/intolerance to hydroxyurea in essential thrombocythemia: results of a consensus process by an international working group. *Leukemia*. 2007;21:277-280.
14. Barosi G, Birgegard G, Finazzi G, et al. Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood*. 2009;113:4829-4833.
15. Wadleigh M, Tefferi A. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms according to the 2008 World Health Organization criteria. *Int J Hematol*;91:174-179.
16. Finazzi G, Barbui T. Evidence and expertise in the management of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Leukemia*. 2008;22:1494-1502.
17. Tefferi A. Classification, Diagnosis and Management of Myeloproliferative Disorders in the JAK2V617F Era. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:240-245.
18. Vannucchi AM, Guglielmelli P, Tefferi A. Advances in understanding and management of myeloproliferative neoplasms. *CA Cancer J Clin*. 2009;59:171-191.
19. Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, et al. Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia. *Leukemia*. 2005;19:1847-1849.
20. Antonioli E, Guglielmelli P, Poli G, et al. Influence of JAK2V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2008;93:41-48.
21. Briddell RA, Hoffman R. Cytokine regulation of the human burst-forming unit-megakaryocyte. *Blood*. 1990;76:516-522.
22. Dupont S, Masse A, James C, et al. The JAK2 617V>F mutation triggers erythropoietin hypersensitivity and terminal erythroid amplification in primary cells from patients with polycythemia vera. *Blood*. 2007;110:1013-1021.
23. Royer Y, Staerk J, Costuleanu M, Courtoy PJ, Constantinescu SN. Janus Kinases Affect Thrombopoietin Receptor Cell Surface Localization and Stability. *J Biol Chem*. 2005;280:27251-27261.
24. Chin H, Arai A, Wakao H, Kamiyama R, Miyasaka N, Miura O. Lyn physically associates with the erythropoietin receptor and may play a role in activation of the Stat5 pathway. *Blood*. 1998;91:3734-3745.
25. Oku S, Takenaka K, Kuriyama T, et al. JAK2 V617F uses distinct signalling pathways to induce cell proliferation and neutrophil activation. *Br J Haematol*;150:334-344.
26. Ugo V, Marzac C, Teyssandier I, et al. Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. *Experimental Hematology*. 2004;32:179.

27. Boyle K, Egan P, Rakar S, et al. The SOCS box of suppressor of cytokine signaling-3 contributes to the control of G-CSF responsiveness in vivo. *Blood*. 2007;110:1466-1474.
28. Hookham MB, Elliott J, Suessmuth Y, et al. The myeloproliferative disorder associated JAK2 V617F mutant escapes negative regulation by suppressor of cytokine signaling 3. *Blood*. 2007;109:4924-4929.
29. Jamieson CHM, Gotlib J, Durocher JA, et al. The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103:6224-6229.
30. Campbell PJ, Baxter EJ, Beer PA, et al. Mutation of JAK2 in the myeloproliferative disorders: timing, clonality studies, cytogenetic associations, and role in leukemic transformation. *Blood*. 2006;108:3548-3555.
31. Gingras S, Parganas E, de Pauw A, Ihle JN, Murray PJ. Re-examination of the Role of Suppressor of Cytokine Signaling 1 (SOCS1) in the Regulation of Toll-like Receptor Signaling. *J Biol Chem*. 2004;279:54702-54707.
32. Scott LM, Scott MA, Campbell PJ, Green AR. Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. *Blood*. 2006;108:2435-2437.
33. Tefferi A. JAK2 mutations in polycythemia vera--molecular mechanisms and clinical applications. *N Engl J Med*. 2007;356:444-445.
34. Kiladjian JJ, Elkassar N, Cassinat B, et al. Essential thrombocythemias without V617F JAK2 mutation are clonal hematopoietic stem cell disorders. *Leukemia*. 2006;20:1181.
35. Jones AV, Chase A, Silver RT, et al. JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*. 2009;41:446-449.
36. Jones AV, Kreil S, Zoi K, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Vol. 106*; 2005:2162-2168.
37. Lambert JR, Everington T, Linch DC, Gale RE. In essential thrombocythemia, multiple JAK2-V617F clones are present in most mutant-positive patients: a new disease paradigm. *Blood*. 2009;114:3018-3023.
38. Kralovics R, Teo SS, Li S, et al. Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood*. 2006;108:1377-1380.
39. Pardanani A, Fridley BL, Lasho TL, Gilliland DG, Tefferi A. Host genetic variation contributes to phenotypic diversity in myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008;111:2785-2789.

40. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet*. 2005;366:1945-1953.
41. Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, et al. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood*. 2008;111:3931-3940.
42. Jaya Kittur, Ryan A. Knudson Terra LLCMFNGAPWC-YLWWRPKAPAT. Clinical correlates of JAK2 V617F allele burden in essential thrombocythemia. *Cancer*. 2007;109:2279-2284.
43. Nussenzveig RH, Swierczek SI, Jelinek J, et al. Polycythemia vera is not initiated by JAK2V617F mutation. *Exp Hematol*. 2007;35:32-38.
44. Li S, Kralovics R, De Libero G, Theocharides A, Gisslinger H, Skoda RC. Clonal heterogeneity in polycythemia vera patients with JAK2 exon12 and JAK2-V617F mutations. *Blood*. 2008;111:3863-3866.
45. Lasho TL, Pardanani A, McClure RF, et al. Concurrent MPL515 and JAK2V617F mutations in myelofibrosis: chronology of clonal emergence and changes in mutant allele burden over time. *Br J Haematol*. 2006;135:683-687.
46. Mercher T, Wernig G, Moore SA, et al. JAK2T875N is a novel activating mutation that results in myeloproliferative disease with features of megakaryoblastic leukemia in a murine bone marrow transplantation model. *Blood*. 2006;108:2770-2779.
47. Rumi E, Passamonti F, Pietra D, et al. JAK2 (V617F) as an acquired somatic mutation and a secondary genetic event associated with disease progression in familial myeloproliferative disorders. *Cancer*. 2006;22:22.
48. Kilpivaara O, Levine RL. JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: discovery and science. *Leukemia*. 2008;22:1813-1817.
49. Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, Gachelin FM, Vainchenker W, Villeval JL. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood*. 2006;108:1652-1660.
50. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009;360:2289-2301.
51. Tefferi A, Lim KH, Abdel-Wahab O, et al. Detection of mutant TET2 in myeloid malignancies other than myeloproliferative neoplasms: CMML, MDS, MDS/MPN and AML. *Leukemia*. 2009;23:1343-1345.

52. Dijon M, Bardin F, Murati A, Batoz M, Chabannon C, Tonnel C. The role of Ikaros in human erythroid differentiation. *Blood*. 2007;blood-2007-2007-098202.
53. Alibes A, Morrissey ER, Canada A, et al. Asterias: A Parallelized Web-based Suite for the Analysis of Expression and aCGH Data. *Cancer Inform*. 2007;3:1-9.
54. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:15545-15550.
55. Tarraga J, Medina I, Carbonell J, et al. GEPAS, a web-based tool for microarray data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Res*. 2008;36:W308-314.
56. Pellagatti A, Vetrie D, Langford CF, et al. Gene expression profiling in polycythemia vera using cDNA microarray technology. *Cancer Res*. 2003;63:3940-3944.
57. Goerttler PS, Steimle C, Marz E, et al. The Jak2V617F mutation, PRV-1 overexpression, and EEC formation define a similar cohort of MPD patients. *Vol*. 106; 2005:2862-2864.
58. Schwemmers S, Will B, Waller CF, et al. JAK2V617F-negative ET patients do not display constitutively active JAK/STAT signaling. *Experimental Hematology*. 2007;35:1695.
59. Puigdecane E, Espinet B, Lozano JJ, et al. Gene expression profiling distinguishes JAK2V617F-negative from JAK2V617F-positive patients in essential thrombocythemia. *Leukemia*. 2008;22:1368-1376.
60. Bruchova H, Merkerova M, Prchal JT. Aberrant expression of microRNA in polycythemia vera. *Haematologica*. 2008;93:1009-1016.
61. Slezak S, Jin P, Caruccio L, et al. Gene and microRNA analysis of neutrophils from patients with polycythemia vera and essential thrombocytosis: down-regulation of micro RNA-1 and -133a. *J Transl Med*. 2009;7:39.
62. Guglielmelli P, Tozzi L, Pancrazzi A, et al. MicroRNA expression profile in granulocytes from primary myelofibrosis patients. *Exp Hematol*. 2007;35:1708-1718.
63. Issaq H, Veenstra T. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. *Biotechniques*. 2008;44:697-698, 700.
64. Mossuz P, Arlotto M, Hermouet S, et al. Proteomic study of the impact of the JAK2-V617F mutation on the phenotype of essential thrombocythemia. *Exp Hematol*. 2008;36:1642-1647.
65. Klippel S, Strunck E, Temerinac S, et al. Quantification of PRV-1 mRNA distinguishes polycythemia vera from secondary erythrocytosis. *Blood*. 2003;102:3569-3574. Epub 2003 Jul 3531.

66. Schevchenko VA, Akayeva EA, Yeliseyeva IM, et al. Human cytogenetic consequences of the Chernobyl accident. *Mutat Res.* 1996;361:29-34.
67. Beer PA, Jones AV, Bench AJ, et al. Clonal diversity in the myeloproliferative neoplasms: independent origins of genetically distinct clones. *Br J Haematol.* 2009;144:904-908.
68. Bermudez VP, Farina A, Raghavan V, Tappin I, Hurwitz J. Studies on human DNA polymerase epsilon and GINS complex and their role in DNA replication. *J Biol Chem.* 286:28963-28977.
69. Polanski R, Maguire M, Nield PC, et al. MDM2 interacts with NME2 (non-metastatic cells 2, protein) and suppresses the ability of NME2 to negatively regulate cell motility. *Carcinogenesis.* 32:1133-1142.
70. Tschiedel S, Gentilini C, Lange T, et al. Identification of NM23-H2 as a tumour-associated antigen in chronic myeloid leukaemia. *Leukemia.* 2008;22:1542-1550.
71. Gatza CE, Oh SY, Blobe GC. Roles for the type III TGF-beta receptor in human cancer. *Cell Signal.* 22:1163-1174.
72. Kajita M, Itoh Y, Chiba T, et al. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol.* 2001;153:893-904.
73. Yu Q, Toole BP. A new alternatively spliced exon between v9 and v10 provides a molecular basis for synthesis of soluble CD44. *J Biol Chem.* 1996;271:20603-20607.
74. Benarafa C, LeCuyer TE, Baumann M, Stolley JM, Cremona TP, Remold-O'Donnell E. SerpinB1 protects the mature neutrophil reserve in the bone marrow. *J Leukoc Biol.* 90:21-29.
75. Chou RH, Wen HC, Liang WG, et al. Suppression of the invasion and migration of cancer cells by SERPINB. *Oncol Rep.* 27:238-245.
76. Tseng MY, Liu SY, Chen HR, et al. Serine protease inhibitor (SERPIN) B1 promotes oral cancer cell motility and is over-expressed in invasive oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2009;45:771-776.
77. Bogani C, Ponziani V, Guglielmelli P, et al. Hypermethylation of CXCR4 promoter in CD34+ cells from patients with primary myelofibrosis. *Stem Cells.* 2008;26:1920-1930.
78. Capello D, Deambrogi C, Rossi D, et al. Epigenetic inactivation of suppressors of cytokine signalling in Philadelphia-negative chronic myeloproliferative disorders. *Br J Haematol.* 2008;141:504-511.
79. Teofili L, Martini M, Cenci T, et al. Epigenetic alteration of SOCS family members is a possible pathogenetic mechanism in JAK2 wild type myeloproliferative diseases. *Int J Cancer.* 2008;123:1586-1592.
80. Fourouclas N, Li J, Gilby DC, et al. Methylation of the suppressor of cytokine signaling 3 gene (SOCS3) in myeloproliferative disorders. *Haematologica.* 2008;93:1635-1644.

81. Barrio S, Gallardo M, Albizua E, et al. Epigenomic profiling in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia shows low levels of aberrant DNA methylation. *J Clin Pathol*;64:1010-1013.
82. Tenedini E, Fagioli ME, Vianelli N, et al. Gene expression profiling of normal and malignant CD34-derived megakaryocytic cells. *Blood*. 2004;104:3126-3135.
83. Albizua E, Gallardo M, Barrio S, et al. Differential expression of JAK2 and Src kinase genes in response to hydroxyurea treatment in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Ann Hematol*;90:939-946.
84. Stetler-Stevenson WG, Bersch N, Golde DW. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) has erythroid-potentiating activity. *FEBS Lett*. 1992;296:231-234.
85. Bock O, Neuse J, Hussein K, et al. Aberrant collagenase expression in chronic idiopathic myelofibrosis is related to the stage of disease but not to the JAK2 mutation status. *Am J Pathol*. 2006;169:471-481.
86. Trudel D, Fradet Y, Meyer F, Harel F, Tetu B. Membrane-type-1 matrix metalloproteinase, matrix metalloproteinase 2, and tissue inhibitor of matrix proteinase 2 in prostate cancer: identification of patients with poor prognosis by immunohistochemistry. *Hum Pathol*. 2008;39:731-739.
87. Cho SY, Xu M, Roboz J, Lu M, Mascarenhas J, Hoffman R. The effect of CXCL12 processing on CD34+ cell migration in myeloproliferative neoplasms. *Cancer Res*;70:3402-3410.
88. Desterke C, Bilhou-Nabera C, Guerton B, et al. FLT3-mediated p38-MAPK activation participates in the control of megakaryopoiesis in primary myelofibrosis. *Cancer Res*;71:2901-2915.
89. Shide K, Shimoda HK, Kumano T, et al. Development of ET, primary myelofibrosis and PV in mice expressing JAK2 V617F. *Leukemia*. 2008;22:87-95.
90. Kamishimoto J, Tago K, Kasahara T, Funakoshi-Tago M. Akt activation through the phosphorylation of erythropoietin receptor at tyrosine 479 is required for myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant-induced cellular transformation. *Cell Signal*;23:849-856.
91. Zaleskas VM, Krause DS, Lazarides K, et al. Molecular pathogenesis and therapy of polycythemia induced in mice by JAK2 V617F. *PLoS One*. 2006;1:e18.
92. Wappl M, Jaeger E, Streubel B, et al. Dasatinib inhibits progenitor cell proliferation from polycythaemia vera. *Eur J Clin Invest*. 2008;38:578-584.
93. Perdomo J, Holmes M, Chong B, Crossley M. Eos and Pegasus, Two Members of the Ikaros Family of Proteins with Distinct DNA Binding Activities. *J Biol Chem*. 2000;275:38347-38354.

94. Hosokawa Y, Maeda Y, Ichinohasama R, Miura I, Taniwaki M, Seto M. The Ikaros gene, a central regulator of lymphoid differentiation, fuses to the BCL6 gene as a result of t(3;7)(q27;p12) translocation in a patient with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2000;95:2719-2721.
95. Lim H, Kim HP. Matrix metalloproteinase-13 expression in IL-1beta-treated chondrocytes by activation of the p38 MAPK/c-Fos/AP-1 and JAK/STAT pathways. *Arch Pharm Res*;34:109-117.
96. De Stefano V, Fiorini A, Rossi E, et al. Incidence of the JAK2 V617F mutation among patients with splanchic or cerebral venous thrombosis and without overt chronic myeloproliferative disorders. Vol. 5; 2007:708-714.
97. Colaizzo D, Amitrano L, Tiscia GL, Grandone E, Guardascione MA, Margaglione M. A new JAK2 gene mutation in patients with polycythemia vera and splanchic vein thrombosis. *Blood*. 2007;110:2768-.
98. McMahon C, Abu-Elmagd K, Bontempo FA, Kant JA, Swerdlow SH. JAK2 V617F mutation in patients with catastrophic intra-abdominal thromboses. *Am J Clin Pathol*. 2007;127:736-743.
99. Chetty C, Vanamala SK, Gondi CS, Dinh DH, Gujrati M, Rao JS. MMP-9 induces CD44 cleavage and CD44 mediated cell migration in glioblastoma xenograft cells. *Cell Signal*.
100. Shirvaikar N, Marquez-Curtis LA, Ratajczak MZ, Janowska-Wieczorek A. Hyaluronic acid and thrombin upregulate MT1-MMP through PI3K and Rac-1 signaling and prime the homing-related responses of cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells Dev*;20:19-30.
101. Song J, Takeda M, Morimoto RI. Bag1-Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth. *Nat Cell Biol*. 2001;3:276-282.
102. Beere HM, Wolf BB, Cain K, et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol*. 2000;2:469-475.
103. Dix DJ, Allen JW, Collins BW, et al. Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:3264-3268.
104. Dame C, Sola MC, Fandrey J, et al. Developmental changes in the expression of transcription factors GATA-1, -2 and -3 during the onset of human medullary haematopoiesis. *British Journal of Haematology*. 2002;119:510-515.
105. Letting DL, Chen Y-Y, Rakowski C, Reedy S, Blobel GA. Context-dependent regulation of GATA-1 by friend of GATA-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101:476-481.
106. Lurie LJ, Boyer ME, Grass JA, Bresnick EH. Differential GATA Factor Stabilities: Implications for Chromatin Occupancy by Structurally Similar Transcription Factors. *Biochemistry*. 2008;47:859-869.



107. Martowicz ML, Grass JA, Bresnick EH. GATA-1-mediated Transcriptional Repression Yields Persistent Transcription Factor IIB-Chromatin Complexes. *J Biol Chem*. 2006;281:37345-37352.
108. Shimizu R, Ohneda K, Engel JD, Trainor CD, Yamamoto M. Transgenic rescue of GATA-1-deficient mice with GATA-1 lacking a FOG-1 association site phenocopies patients with X-linked thrombocytopenia. *Blood*. 2004;103:2560-2567.
109. Vasikova A, Belickova M, Budinska E, Cermak J. A distinct expression of various gene subsets in CD34+ cells from patients with early and advanced myelodysplastic syndrome. *Leuk Res*;34:1566-1572.
110. Yeh CH, Tseng R, Hannah A, et al. Clinical correlation of circulating heat shock protein 70 in acute leukemia. *Leuk Res*;34:605-609.
111. Schmitt E, Parcellier A, Gurbuxani S, et al. Chemosensitization by a non-apoptogenic heat shock protein 70-binding apoptosis-inducing factor mutant. *Cancer Res*. 2003;63:8233-8240.
112. Schmitt E, Gehrmann M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol*. 2007;81:15-27.
113. Madamanchi NR, Li S, Patterson C, Runge MS. Reactive oxygen species regulate heat-shock protein 70 via the JAK/STAT pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:321-326.
114. Marubayashi S, Koppikar P, Taldone T, et al. HSP90 is a therapeutic target in JAK2-dependent myeloproliferative neoplasms in mice and humans. *J Clin Invest*;120:3578-3593.
115. Ebong IO, Morgner N, Zhou M, et al. Heterogeneity and dynamics in the assembly of the Heat Shock Protein 90 chaperone complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*;108:17939-17944.
116. Sims JD, McCready J, Jay DG. Extracellular heat shock protein (Hsp)70 and Hsp90alpha assist in matrix metalloproteinase-2 activation and breast cancer cell migration and invasion. *PLoS One*;6:e18848.

## **8. Listado de Publicaciones**

Albizua E\*, **Gallardo M\***, Barrio S\*, et al. Differential expression of JAK2 and Src kinase genes in response to hydroxyurea treatment in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Ann Hematol*;90:939-946.

\* Los tres primeros autores contribuyeron por igual.

Barrio S\*, **Gallardo M\***, Albizua E, et al. Epigenomic profiling in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia shows low levels of aberrant DNA methylation. *J Clin Pathol*;64:1010-1013.

\*Los dos primeros autores contribuyeron por igual.

**Gallardo M**, Fernandez M, Paradela A, et al. Proteomic analysis reveals HSP70 has a key role in polycythemia vera. *Molecular Cancer Therapeutics*.

Nota: Pendiente de publicación

Albizua E, **Gallardo M**, Jimenez A, Barrio S y Martinez-Lopez J. *POLICITEMIA VERA: CUADRO CLÍNICO, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO EN LA ERA DE JAK2*. Jano. Medicina y Humanidades. 2010

## **Listado de Comunicaciones (selección)**

**Gallardo M**, Fernandez M, Paradela A, Toldos O, Garcia-Martin R, Barrio S, Ayala R, Albizua E, Rapado I, Jimenez A, Candelas M, Gilsanz F, Martinez-Lopez J. Proteomic analysis identifies HSP70 as a novel target therapy to polycythemia vera. *Blood* (ASH

Annual Meeting Abstracts) 2011. Presented at 53th ASH Annual Meeting, San Diego, December 2011.

**Gallardo M**, Barrio S, Ayala R, Albizua E, Rapado I, Jimenez A, Candelas M, Toldos O, Fernández M, Paradelo A, Redondo S, García V, Ángel Hernández JA and Martínez-López J. *ROLE OF METALLOPROTEASES IN POLYCYTHEMIA VERA AND ESSENTIAL THROMBOCYTHEMIA ERYTHROID DIFFERENTIATION*. 16th Congres of the European Hematology Association (EHA). London 8-12 of June 2011. Pub in Hematologica (ed. esp).

**Gallardo M**, Barrio S, Albizua E, Rapado I, Jimenez A, Ayala R, Rueda D, Puigdecane E, Espinet B, Florensa L, Besses C and Martinez-Lopez J. *Gene expression profile in Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms (MPNs) under treatment with Hydroxyurea*. 16th Congres of the European Hematology Association (EHA). Barcelona 10-13 of June 2010. Pub in Hematologica (ed. esp). November 2009

**Gallardo M**, Barrio S, Albizua Q, Fernández-Rueda D, Rapado I, Espinet B, Puigdecane E, Florensa L, Piris MA, Martínez-López J. Perfil de expresión génica asociada a la falta de respuesta a Hidroxiurea de neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPc) *JAK2V617F* positivas. L National reunion AEHH. XXV National congress of SETH Association. Barcelona 12-14 of November 2009.

## 9. Anexos

Ann Hematol  
DOI 10.1007/s00277-011-1179-2

ORIGINAL ARTICLE

### Differential expression of JAK2 and Src kinase genes in response to hydroxyurea treatment in polycythemia vera and essential thrombocythemia

Enriqueta Albizua · Miguel Gallardo · Santiago Barrio · Inmaculada Rapado · Ana Jimenez · Rosa Ayala · Daniel Rueda · Beatriz Sanchez-Espiridion · Eulalia Puigdecenet · Blanca Espinet · Lourdes Florensa · Carles Besses · Joaquín Martínez-López

Received: 10 December 2010 / Accepted: 31 January 2011  
© Springer-Verlag 2011

**Abstract** This study investigates the differential gene expression profile of JAK2<sup>V617F</sup>-positive myeloproliferative neoplasm (MPN) patients, with and without response to hydroxyurea (HU) treatment. Twenty-one polycythemia vera, 28 essential thrombocythemia, eight secondary erythrocytosis, and 30 controls were studied. Thirty-four genes were overexpressed in patients who did not respond to HU. Of these, some participate in proliferative pathways: *MAPK*, *AKT*, Src kinase (SFK), and JAK2 pathway. JAK2 allele burden was similar between groups of responders and nonresponder. A molecular fingerprint distinguishes JAK2<sup>V617F</sup>-positive MPN

patients without response to HU treatment, with overexpression of *JAK2*, *MAPK14*, *PIK3CA*, and *SFK* genes.

**Keywords** Polycythemia vera · Essential thrombocythemia · Gene expression profile · RT-PCR · Response to hydroxyurea · JAK2 · Src family kinase (SFK)

#### Introduction

The discovery of the JAK2<sup>V617F</sup> point mutation has become a hallmark in the diagnosis of the classic chronic Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms (MPN) namely, polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), and primary myelofibrosis (PMF) [1]. As a result, WHO diagnostic criteria were revised in 2007, and JAK2 mutations and *MPL* mutations were included as major criteria for the diagnosis of PV, ET, and PMF [2]. Moreover, the JAK2<sup>V617F</sup> allele burden has been included in response criteria for PV and ET by a recent European Leukaemia Net (ELN) consensus conference [3]. Despite the fact that JAK2<sup>V617F</sup> has facilitated the diagnosis of MPN and improved our knowledge on their pathogenesis, there are still a number of unanswered questions [4].

Although formerly believed to be a single-step process, recent evidence has shown that the JAK2<sup>V617F</sup> mutation is neither the sole, nor sufficient molecular event, responsible for MPN. It may also not be the initial one, and other somatic mutations may precede JAK2<sup>V617F</sup> [5–7]. There is evidence of clonal heterogeneity and presence of different mutations in the same patient [8, 9].

The current first line of treatment for PV and ET patients with a high risk of thrombosis is still hydroxyurea (HU) [10]. The cytoreductive activity of HU is based on its anti-

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00277-011-1179-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

E. Albizua · M. Gallardo · S. Barrio · I. Rapado · A. Jimenez · R. Ayala · D. Rueda · J. Martínez-López (✉)  
Servicio de Hematología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Avenida Córdoba s/n, 28041 Madrid, Spain  
e-mail: jmartinezlo@yahoo.es

E. Albizua  
Servicio de Hematología, Hospital Virgen de la Salud, Toledo, Spain

B. Sanchez-Espiridion  
Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Madrid, Spain

E. Puigdecenet · B. Espinet · L. Florensa  
Laboratori de Citologia Hematològica/Citogenètica Molecular, Servei de Patologia, GRETNHE, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Spain

C. Besses  
Servicio de Hematología, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Spain

Published online: 18 February 2011

 Springer

<http://www.springerlink.com/content/1x5726565043k645/?MUD=MP>

## Original article

# Epigenomic profiling in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia shows low levels of aberrant DNA methylation

S Barrio,<sup>1</sup> M Gallardo,<sup>1</sup> E Albizua,<sup>1,2</sup> A Jimenez,<sup>1</sup> I Rapado,<sup>1</sup> R Ayala,<sup>1,3</sup> F Gilsanz,<sup>1,3</sup> J I Martin-Subero,<sup>4</sup> J Martinez-Lopez<sup>1,3</sup>

► An additional figure is published online only. To view this file please visit the journal online (<http://jcp.bmj.com>).

<sup>1</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Avenida Córdoba s/n, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Servicio de Hematología, Hospital Virgen de la Salud, Toledo, Spain

<sup>3</sup>Universidad Complutense, Madrid, Spain

<sup>4</sup>Department of Anatomic Pathology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

## Correspondence to

J Martinez-Lopez, Servicio de Hematología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Avenida Córdoba s/n, Madrid 28041, Spain; [jmartinezlo@hematologia12octubre.com](mailto:jmartinezlo@hematologia12octubre.com)

Accepted 20 June 2011  
Published Online First  
6 August 2011

## ABSTRACT

**Aims** The purpose of this study was to compare the DNA-methylation signature in classic chronic Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms (MPN), polycythaemia vera (PV) and essential thrombocythaemia (ET), in order to obtain a global insight into DNA-methylation changes associated with these malignancies.

**Methods** Thirty-five MPN samples from 11 ET JAK2 V617F, 12 ET JAK2 wild type (WT) and 12 PV JAK2 V617F patients as well as 12 from healthy donors were analysed. DNA samples extracted from whole peripheral blood were hybridised to the 'HumanMethylation27 DNA Analysis BeadChip.'

**Results** All groups showed a very homogeneous methylation pattern. Only the ZNF577 gene showed a differential methylation profile between PV JAK2 V617F positive and controls. This aberrant methylation was correlated with a differential gene expression of ZNF577. No aberrant hypermethylation was found in the SOCS-1 and SOCS-3 genes.

**Conclusions** According to our results, an aberrant methylation pattern does not seem to play a crucial role in MPN pathogenesis; nor does it justify phenotypical differences between PV and ET.

JAK2 V617F MPN. Novel mutations have been found, though none of them specific of MPN. In addition, postgenomic abnormalities as well as polymorphisms may contribute to phenotypic divergence. Nonetheless many aspects of the pathogenesis of these entities remain unknown.<sup>5,6</sup>

In these malignancies, different epigenetic abnormalities have been described. ITF2357, a novel histone deacetylase (HDAC) inhibitor with anti-tumour activity, was assayed on cells carrying the JAK2 V617F mutation obtained from PV, ET<sup>7</sup> and PMF.<sup>8</sup> As a consequence, a phase II study has been conducted to evaluate the safety and efficacy of ITF2357 in MPN.<sup>9</sup>

An aberrant methylation of individual genes has also been found in MPN. The differential methylation pattern of the suppressors of cytokine signalling (SOCS) genes may contribute to the pathogenesis and differential phenotype of these neoplasias. Teofili *et al* found that SOCS-1 or SOCS-3 hypermethylation can activate the JAK/STAT signalling pathway as an alternative, or together with JAK2 mutations.<sup>10</sup> Hypermethylation of a further gene, CXCR4, down-regulated in primary myelofibrosis, has been found to contribute to the migration of CD34 cells in this disease.<sup>11</sup>

The objective of the present study was to obtain a global insight into DNA-methylation changes associated with PV and ET through a microarray-based DNA methylation assay, in order to improve our knowledge on their pathogenesis.

## MATERIAL AND METHODS

### Patients

A total of 35 samples from classic chronic Ph-negative MPN patients including 11 ET JAK2 V617F, 12 ET JAK2 WT and 12 PV JAK2 V617F, as well as 12 peripheral blood samples from healthy donors were analysed in the present study. Diagnosis were established according to WHO criteria.<sup>12</sup> Out of 35 patients (21 women/14 men), with a mean age of 59.5 years (range: 34–78), three of them presented thrombotic events at diagnosis. The mean platelet count ( $\times 10^9/l$ ) was 421 (201–1328) in PV and 747.5 (455–1896) in ET. The haemoglobin (g/dl) was 18.7 (17.5–21.7) in PV and 14.8 (11.9–16.2) in ET. Six PV and three ET cases had leucocytosis ( $>12.5 \times 10^6$  leucocytes/l) at diagnosis. The mean leucocyte count ( $\times 10^9/l$ ) in PV was 12.4, range 8–20.1, and in ET 4.8, range 4.8–13.7. All MPN samples contained over 70% of neutrophils.

## INTRODUCTION

Alterations in the epigenetic code, which comprises reversible modifications that affect gene expression without altering the DNA sequence itself, are a molecular hallmark of haematological malignancies.<sup>1</sup> The best-studied epigenetic change is the hypermethylation of tumour suppressor genes, reported to be associated with gene inactivation, while the importance of epigenetics in haematological malignancies is underlined by the use of DNA-demethylating agents to treat myeloid disorders.<sup>2</sup>

BCR-ABL-negative myeloproliferative neoplasms (MPN) including polycythaemia vera (PV), essential thrombocythaemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF) are characterised by a clonal expansion of a multipotent haematopoietic progenitor cell.<sup>3</sup> JAK2 V617F mutation results in a constitutive activation of JAK/STAT signalling and occurs in about half of the patients with ET and PMF; and in more than 90% of those with PV.<sup>4</sup> Despite its extraordinary importance, recent studies have demonstrated that JAK2 V617F is neither the sole event nor even sufficient, nor probably the first molecular event in



## **Proteomic analysis reveals HSP70 has a key role in polycythemia vera**

**Running head:** HSP70 plays a key role in PV

Miguel Gallardo,<sup>1 PhD</sup> Marisol Fernandez,<sup>2 PhD</sup> Alberto Paradelo,<sup>2 PhD</sup> Santiago Barrio,<sup>1 S.B.</sup>  
Oscar Toldos,<sup>4 M.D.</sup> Rosa Ayala,<sup>1 PhD</sup> Enriqueta Albizua,<sup>1-3 M.D.</sup> Ana Jimenez,<sup>1 M.D.</sup> Santiago  
Redondo,<sup>5 PhD</sup> Rosa Maria Garcia-Martin,<sup>4 S.B.</sup> Florinda Gilsanz,<sup>1 PhD</sup> Juan Pablo Albar,<sup>2 PhD</sup>  
and Joaquin Martinez-Lopez.<sup>1 PhD</sup>

<sup>1</sup>Hematology Service, Hospital Universitario 12 de Octubre, Avenida Córdoba s/n,  
28041 Madrid; <sup>2</sup>Proteomics Facility, Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Madrid;  
<sup>3</sup>Hematology Service, Hospital Virgen de la Salud, Toledo; <sup>4</sup>Pathology service, Hospital  
Universitario 12 de Octubre, Madrid; <sup>5</sup>Hematology Service, Nuestra Señora de Sonsoles,  
Avila, Spain

### **Correspondence and reprint requests:**

Corresponding Author: Miguel Gallardo and Joaquin Martinez-Lopez

Servicio de Hematología

Hospital Universitario 12 de Octubre

Av/ Cordoba s/n

28041 Madrid, Spain

Phone and Fax: 0034+91 3908495

E-mail: [miguelgallardodelgado@gmail.com](mailto:miguelgallardodelgado@gmail.com)

[jmartinezlo@hematologia12octubre.com](mailto:jmartinezlo@hematologia12octubre.com)

## Abstract

JAK-STAT signaling through the JAK2<sup>V617F</sup> mutation is central to the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms (MPN). However, other events could precede the JAK2 mutation. The aim of this study is to analyze the phenotypic divergence between PV and ET to find novel therapeutics targets by a proteomic and functional approach to identify alternative routes to JAK2 activation. Through 2D-DIGE and mass spectrometry of granulocyte protein from 20 MPN samples, showed differential expression of HSP70 in PV and ET besides other 60 proteins. Western blots and immunohistochemistry of 45 MPN bone marrow samples confirmed HSP70 expression. The median of positive granulocytes was 80% in PV (SD 0.35%) vs. 23% in ET (SD 34.25%). In an *in vitro* model *KNK437* was used as an inhibition model assay of HSP70, showed dose-dependent inhibition of cell growth and burst formation unit erythroid (BFU-E) in PV and ET, increased apoptosis in the erythroid lineage, and decreased pJAK2 signaling. These data suggest a key role for HSP70 in proliferation and survival of the erythroid lineage in PV, and may represent a potential therapeutic target in MPN, especially in PV.

**Key words:** polycythemia vera, essential thrombocythemia, HSP70, 2D-DIGE/MS

